



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

**EFEITOS TARDIOS DO ISOLAMENTO SOCIAL NEONATAL E DO
DESAMPARO APRENDIDO SOBRE OS NÍVEIS TISSULARES E TAXA DE
RENOVAÇÃO DA SEROTONINA DAS REGIÕES DORSAL E
VENTROLATERAL DA MATÉRIA CINZENTA PERIAQUEDUTAL DE RATOS**

Dissertação de Mestrado em Ciências Fisiológicas

CAROLINE AZEVEDO ROSA

Orientador:

PROF. DR. LUIZ CARLOS SCHENBERG

Vitória, E.S

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, para obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Vitória, 27 de agosto de 2012.

Rosa, Caroline Azevedo

Título: Efeitos Tardios do Isolamento Social Neonatal e do Desamparo Aprendido sobre os Níveis Tissulares e Taxa de Renovação da Serotonina das Regiões Dorsal e Ventrolateral da Matéria Cinzenta Periaquedutal de Ratos.

Caroline Azevedo Rosa – Vitória, 2012.

Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos Schenberg

1. Matéria cinzenta periaquedutal 2. Pânico 3. Isolamento social neonatal 4. Desamparo aprendido 5. Serotonina

**EFEITOS TARDIOS DO ISOLAMENTO SOCIAL NEONATAL E DO
DESAMPARO APRENDIDO SOBRE OS NÍVEIS TISSULARES E TAXA DE
RENOVAÇÃO DA SEROTONINA DAS REGIÕES DORSAL E
VENTROLATERAL DA MATÉRIA CINZENTA PERIAQUEDUTAL DE RATOS**

Caroline Azevedo Rosa

**Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Ciências Fisiológicas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade
Federal do Espírito Santo, como requisito para a obtenção do Título de
Mestre em Ciências Fisiológicas.**

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Luiz Carlos Schenberg (Orientador-UFES)

Prof. Dra. Angela Maria Ribeiro

Prof. Dr. Alexandre Martins da Costa Santos

Vitória, 27 de agosto de 2012

Aos meus pais, porque sei que abrem mão de vários sonhos para que o mundo me reserve o melhor...

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, quero agradecer a minha família, pois sem nem saber direito o que faço, sempre me deram apoio! Amo muito todos vocês: Heleno (pai), Rosangela (mãe), Michelle (irmã), Lucas (irmão) e o mais novo membro, Davi (sobrinho). Em especial, meu pai e minha mãe que nunca mediram esforços na educação dos filhos, sou eternamente grata por tudo que fizeram por mim. Meu namorado, Felício, a pessoa que mais ouviu minhas lamentações e reclamações durante o mestrado... Com certeza ele não aguenta mais ouvir falar em serotonina... hehehe! Amo você! Você é incrível! Obrigada por tudo!!!!

Ao meu orientador, Prof. Schenberg, por ter me aceitado no laboratório sem nem saber quem eu era, permitindo a minha convivência com a ciência, o que contribuiu demais para o meu amadurecimento tanto pessoal quanto profissional. Acima de tudo, fico muito grata por ter me dado um projeto muito importante que eu amei fazer.

Aos colegas do Laboratório de Neurobiologia: Fagna, pela amizade, pelas caronas, pessoa muito gente boa... Cláudia, sempre pronta para ensinar... Carlos, aluno de IC super competente que me ajudou bastante com os experimentos do DA... Ana, gente finíssima, alto-astrol, amiga... Tiago, que entrou agora, mas já vi que dá pra trabalhar junto!! Obrigada a todos! Em especial, é claro, a Rúbia e o Cristie. Ciência não se faz sem parcerias. As contribuições de vocês foram fundamentais. Nem daria para agradecer aqui neste papel. Foram tantos momentos engraçados, discussões sem fim, gargalhadas, alguns “arranca-rabo”... que eu vou morrer de saudades!!

Aos professores Ciciline e Alexandre, que abriram as portas do laboratório de Bioquímica que eu tanto precisei. Foram tantos reagentes e tantas vidrarias utilizados... mesmo para os experimentos que não entraram na dissertação. Sou imensamente grata! Também tem outros laboratórios que eu vivia pedindo coisas emprestadas e usando materiais/aparelhos, como o laboratório do Nardy, da Suely, da Cristina e da Rita, do Dalton, da Nazaré e até do pessoal do NDI.

Um agradecimento especial ao Laboratório de Neurociência Comportamental e Molecular (LaNec), da UFMG, liderado pela Prof^a Angela Ribeiro, que disponibilizou tudo que foi necessário para a dosagem da serotonina. A contribuição da Prof. Angela foi, literalmente, essencial para este trabalho. Ao aluno Fábio Vigil que me acompanhou em todas as dosagens, se dedicando ao máximo, como se o experimento fosse dele. Não tenho palavras para agradecer aos dois. Com certeza, sem a contribuição deles não seria possível concluir esta pesquisa.

Aos membros titulares da banca de defesa: Prof. Dr. Alexandre Martins e Prof^a. Dr^a Angela Maria Ribeiro. Por aceitarem avaliar meu trabalho e com certeza, contribuirão, com seus conhecimentos e sugestões, para os próximos passos desta pesquisa.

Aos amigos da pós: Laís, Pedro, Thiago, Leandro, Léo, Tatá, Cris e Rúbia... Não daria para descrever aqui as pérolas de cada um, pois daria, no mínimo, um livro, rs! Foram momentos incríveis que passamos juntos! Já dá saudade em pensar que o destino vai levar cada um para um lado... mas... é TUDO NOSSO! E as amigas da vida, ou melhor, de Cachoeiro: Camila, Cynara, Janine, Nayara, Flávia, Natália, Michelle, Juliana...

Também quero agradecer a Ele, o Rato! O grande responsável pelos meus resultados. Mesmo passando muita raiva com ele quando eu ainda trabalhava com o “kindling” da amígdala, somos todos gratos a essa criaturinha.

Financeiramente, tenho que agradecer a CAPES, que me forneceu a bolsa durante os dois anos de pós, e ao PPGCF por ter bancado quase todas as minhas viagens para Belo Horizonte.

Enfim, quero agradecer a todas as pessoas que me ajudaram e colaboraram de alguma forma, mínima que seja, para a conclusão da dissertação.

Obrigada!



ABREVIATURAS

5-HIAA	Ácido 5-hidroxi-indolacético
5-HT	Serotonina
5-HTT	Transportador de Serotonina
ACTH	Corticotrofina
AP	Ataque de Pânico
APA	Associação Psiquiátrica Americana
ASI	Ansiedade de separação na infância
AVT	Área ventral tegumentar
BDZ	Benzodiazepínicos
CCK	Colecistocinina
CE	Choque escapável
CI	Choque inescapável
CPF	Córtex pré-frontal
CPFm	Córtex pré-frontal medial
CORT	Corticosterona
DA	Desamparo aprendido
DM	Depressão maior
DSM	Manual de Estatística e Diagnóstico da Sociedade Americana de Psiquiatria
EP	Erro padrão
EPM	Erro padrão da média
GABA	Ácido gama-aminobutírico
HDG	Hipótese Deakin & Graeff
HPA	Eixo hipotálamo-hipófise-adrenal
HPLC	Cromatografia líquida de alto desempenho

IP	Intraperitoneal
ISN	Isolamento Social Neonatal
ISRSs	Inibidores seletivos da recaptação de serotonina
LCE	Labirinto-em-cruz elevado
LTE	Labirinto-em-T elevado
MCPA	Matéria cinzenta periaquedutal
MCPD	Matéria cinzenta periaquedutal dorsal
MCPV	Matéria cinzenta periaquedutal ventral
MCPVL	Matéria cinzenta periaquedutal ventrolateral
mCPP	Meta-clorofenilpiperazina
NDR	Núcleo dorsal da rafe
NMR	Núcleo mediano da rafe
NP	Ratos não privados
NOs	Sintetase do Óxido Nítrico
P	Ratos privados
PAD	Procedimento de aprendizado do desamparo
PM	Privação materna
TEP	Tomografia por emissão positrônica
PRL	Prolactina
TAG	Transtorno de ansiedade generalizada
TP	Transtorno do pânico
TR-5HT	Taxa de renovação da serotonina
SPECT	Tomografia computadorizada por emissão de fóton
VG	Ratos controles virgens

ÍNDICE

RESUMO	1
ABSTRACT	3
REVISÃO.....	4
1. Breve Histórico do Transtorno do Pânico.....	4
2. A matéria cinzenta periaquedutal como substrato para o Transtorno do Pânico	6
3. Papel da Serotonina no Transtorno do Pânico	11
4. Comorbidade dos Transtornos Ansiosos e Depressivos com Transtorno do Pânico	19
OBJETIVOS.....	26
ESTUDO I:	
EFEITOS DO ISOLAMENTO SOCIAL NEONATAL PARCIAL NO METABOLISMO DA SEROTONINA NA MATÉRIA CINZENTA PERIAQUEDUTAL DORSAL E VENTROLATERAL DO RATO	27
RESUMO	28
INTRODUÇÃO.....	29
MATERIAIS E MÉTODOS	31
ANIMAIS	31
PROCEDIMENTOS.....	31
Privação materna.....	31
Coleta das amostras de tecido da MCPA	32
Análise dos níveis tissulares de 5-HT, 5-HIAA e da TR-5HT da MCPA.....	33
Análise estatística	34
RESULTADOS.....	35
DISCUSSÃO	37
ESTUDO II:	
EFEITOS DO DESAMPARO APRENDIDO NO METABOLISMO DA SEROTONINA NA MATÉRIA CINZENTA PERIAQUEDUTAL DORSAL E VENTROLATERAL DO RATO.....	42
RESUMO	43
INTRODUÇÃO.....	44
MATERIAIS E MÉTODOS	46

ANIMAIS	46
PROCEDIMENTOS.....	46
Procedimento de aprendizado de desamparo (PAD)	47
RESULTADOS.....	48
DISCUSSÃO	51
CONCLUSÕES.....	56
REFERÊNCIAS.....	57
ANEXOS	81

RESUMO

Estudos em animais mostraram que enquanto a estimulação elétrica da metade dorsal da matéria cinzenta periaquedutal (MCPD) produz comportamentos de congelamento (*freezing*) e fuga similares aos ataques de pânico, a estimulação da região ventrolateral (MCPVL) inibe estas respostas. Estudos clínicos e epidemiológicos sugerem, por outro lado, que o transtorno de pânico seja facilitado tanto pela ansiedade de separação na infância (ASI) como pelos transtornos depressivos e/ou traumáticos. Contudo, dados recentes do nosso laboratório mostraram que enquanto as respostas à estimulação da MCPD foram facilitadas em ratos adultos submetidos ao isolamento social neonatal (ISN), um modelo de ASI, elas foram inibidas em ratos com desamparo aprendido (DA), um modelo de depressão e/ou trauma. Portanto, como os agentes serotoninérgicos são as drogas de primeira escolha no tratamento do pânico e da depressão, o presente estudo examinou os níveis teciduais de serotonina (5-HT) e do seu principal metabólito (5-HIAA), bem como a taxa de renovação da 5-HT (*turnover*), nas regiões dorsal e ventrolateral da MCPA de ratos adultos submetidos ao ISN ou DA. O ISN foi realizado diariamente ao longo do período de lactação (PN2-PN21) colocando-se um filhote numa caixa nova por 3 h enquanto os irmãos (controles) e a mãe eram transferidos a outra caixa em sala separada. No DA, os ratos eram colocados em caixas de vaivém (*shuttle-box*) dotadas de assoalhos eletrificados, e submetidos a um treino conjugado (*yoked*) de fuga de uma via a choques escapáveis (CE) ou inescapáveis (CI). No dia seguinte, o DA era avaliado pelo desempenho dos ratos numa fuga de duas vias (sessão-teste). Os animais eram sacrificados 7 e 30 dias após o término dos procedimentos de DA e ISN, respectivamente. As amostras tissulares eram coletadas pelo picoteamento (*punch*) de cortes coronais de 1 mm de espessura da MCPD e MCPVL e analisadas por cromatografia de alto desempenho (HPLC). Os dados dos grupos DA e ISN foram comparados àqueles de ratos virgens (VG). Comparados ao grupo VG, os ratos expostos ao CE apresentaram aumentos significantes dos níveis de 5-HT na MCPD, enquanto os ratos expostos ao CI apresentaram aumentos na

MCPVL. Como não foram observadas alterações significantes nos níveis do 5-HIAA, a tendência no aumento da taxa de renovação foi provavelmente devida ao aumento na síntese de 5-HT. Contrariamente, o ISN não teve efeitos diferenciados na MCPD e MCPVL. De fato, embora os grupos ISN e controle tenham apresentado aumentos significantes dos níveis e taxa de renovação de 5-HT em relação ao grupo VG, não foram observadas diferenças entre os primeiros. Concluindo, o presente estudo sugere que os efeitos tardios do DA sobre as respostas de defesa eliciadas pela estimulação da MCPD podem ser devidos aos aumentos diferenciados dos níveis de 5-HT na MCPD e MCPVL pela exposição ao CE e CI, respectivamente. Ao contrário, a facilitação destas respostas pelo ISN não pode ser explicada pelas alterações nos níveis de 5-HT.

Palavras-chave: Matéria Cinzenta Periaquedutal, Pânico, Isolamento Social Neonatal, Desamparo Aprendido, Serotonina

ABSTRACT

In rats, electrical stimulations of the dorsal half of the periaqueductal gray matter (DPAG) produce freezing and flight behaviors and marked autonomic changes that have been proposed to model panic attacks. Contrarily, stimulations of the ventral half of the PAG (VLPAG) inhibit these behaviors. On the other hand, although the clinical and epidemiological studies suggest that panic is favored by both the childhood separation anxiety (CSA) and depression and/or trauma, recent data from our laboratory showed that the neonatal social isolation (NSI) model of CSA facilitates the DPAG-evoked panic behaviors of adult rats, whereas the learned helplessness (LH) model of depression produces a long-lasting inhibition of these behaviors. Thus, because the serotonergic agents are the first-choice treatment of both panic and depression, here we examined the tissue levels of both serotonin (5-HT) and its main metabolite (5-HIAA), and the 5-HT turnover (5-HT/5-HIAA) of dorsal and ventrolateral PAG. Briefly, rats were subjected to either a 3-h NSI throughout the lactation period or a shuttle-box one-way escape yoked training with footshocks either escapable (ES) or inescapable (IS). Rats were sacrificed 7 and 30 days following the terminus of LH and NSI procedures, respectively. Samples were then collected through punching of 1 mm-thick coronal sections and prepared for HPLC assays. Data of LH and NSI groups were compared to respective histochemical assays of naïve rats (NV). LH data showed that whereas the rats exposed to escapable shocks presented significant increases in the 5-HT levels of the DPAG, those exposed to inescapable shocks did it for the VLPAG. Thus, although the corresponding increases in 5-HT turnover did not reach a statistically significant level, the lack of changes in 5-HIAA levels suggests that 5-HT level increases were due to an augmented synthesis of the neurotransmitter in both the DPAG and VLPAG of escapable and inescapable shock groups, respectively. Contrarily, 5-HT levels and turnover were similarly increased in NSI and control siblings as compared to the NV group. Concluding, the present data suggest that the 5-HT is involved in the late consequences of the LH, but not of the NSI, on DPAG-evoked defensive behaviors.

REVISÃO

1. Breve Histórico do Transtorno do Pânico

Os transtornos de ansiedade foram primeiramente classificados nos estudos pioneiros de Sigmund Freud (1896) sobre as “neuroses de ansiedade” (*Angstneurose*). Freud distinguiu estes transtornos da depressão maior (melancolia) e de uma ampla gama de condições psiquiátricas denominadas à época de “neurastenias”. De fato, em escritos tão precoces quanto os “Estudos Seleccionados sobre a Histeria” (1896), Freud já distinguia duas síndromes fundamentais de ansiedade, quais sejam, a “expectativa ansiosa” ou “apreensão” (*Angstliche*), que ele considerava a forma predominante do transtorno de ansiedade, e uma síndrome menos frequente, porém igualmente importante, que ele denominou “ataque de ansiedade” (*Angstanfall*). De acordo com suas descrições, a expectativa ansiosa consistia num *“quantum de ansiedade livre e flutuante que controlava a escolha de idéias por antecipação”*. Em contraste, nos ataques de ansiedade a *“ansiedade irrompia repentinamente na consciência sem ter sido eliciada por qualquer idéia”*. Freud ressaltou que estes ataques podiam manifestar-se tanto como *“um sentimento puro de ansiedade”* quanto pela combinação da ansiedade com *“a interpretação mais próxima do término na vida, tal como a idéia de morte súbita ou da perda da razão”* ou combinados à *“alguma parestesia”[ou ao] distúrbio de uma ou mais funções somáticas, tais como a respiração, atividade cardíaca, inervação vasomotora e atividade glandular*. Eventualmente, Freud distinguiu estes ataques das fobias, do transtorno obsessivo-compulsivo (neurose obsessiva) e transtorno do estresse pós-traumático (neurose comum), dentre outras condições. Suas descrições clínicas de “expectativa ansiosa” e “ataque de ansiedade” são bastante similares aos diagnósticos atuais do transtorno de ansiedade generalizada (TAG) e transtorno no pânico (TP), respectivamente (APA, 2000).

Presumivelmente, a herança clínica de Freud foi, em grande medida, esquecida após o divórcio profundo entre psicanálise e medicina.

Assim, enquanto os transtornos de ansiedade continuaram a ser diagnosticados como neurastenias até meados do século passado, o TP recebeu uma variedade enorme de nomes, incluindo neurose da ansiedade, reação de ansiedade, neurastenia, astenia neurocirculatória, neurose vasomotora, taquicardia nervosa, síndrome de esforço, síndrome de Da Costa, coração de soldado e coração irritável, entre outros (Pitts e McClure, 1967). Este cenário começou a alterar-se após a publicação do estudo influente de Donald Klein (1964) mostrando que o TAG e o TP respondiam a classes diferentes de drogas. Klein mostrou que enquanto a “*expectativa ansiosa*” era tratável por ansiolíticos (barbitúricos, meprobamato, e clordiazepóxido) e doses baixas de sedativos (fenotiazinas), os ataques de pânico eram tratáveis pela administração crônica do antidepressivo tricíclico imipramina.

Ao redor da mesma época, Pitts e McClure (1967) demonstraram que os ataques de pânico (AP) tinham “marcadores fisiológicos”, uma vez que eles podiam ser precipitados pela infusão endovenosa de lactato de sódio em pacientes predispostos aos ataques espontâneos de pânico, mas não em voluntários normais. Na realidade, Cohen e White (1951) já haviam mostrado que os AP podiam ser precipitados por hiperventilação a 5% de dióxido de carbono (CO₂), mas não no exercício ou na ventilação ambiente (Klein, 1993b). Estudos posteriores forneceram provas numerosas das propriedades panicogênicas do lactato de sódio e CO₂, bem como de outros agentes (Graeff *et al.*, 2005). Posteriormente, mostrou-se que a ioimbina, um antagonista alfa-2 adrenérgico, também induz pânico em mais de dois terços dos pacientes de TP, principalmente após administração endovenosa (Charney *et al.*, 1984). Contudo, a infusão de ioimbina também provocou o aumento da ansiedade em pessoas normais, tal como ocorre com a cafeína, colecistocinina (CCK) e inúmeras drogas com ação panicogênica (Klein, 1993b). A sensibilidade específica às drogas e a existência de marcadores fisiológicos do TP sugeriram a existência de um circuito cerebral disparando de forma não-adaptativa. Não obstante, o TP somente seria incluído na classificação dos transtornos de ansiedade da Associação Psiquiátrica Norte-Americana um século após as observações pioneiras de Freud (APA, 1980).

Atualmente, o TP é considerado como uma síndrome distinta tanto do TAG quanto dos demais transtornos de ansiedade. Contudo, os pacientes de TP queixam-se frequentemente de 'ansiedade antecipatória', isto é, o temor de desamparo na eventualidade de um ataque de pânico, condição que pode agravar-se em agorafobia incapacitante. Consequentemente, a presença da ansiedade antecipatória tem sido um complicador adicional dos estudos clínicos sobre os mecanismos neurais dos AP (Graeff *et al.*, 2005).

Os AP são episódios agudos de medo, ou sensação similar, que ocorrem de forma recorrente e na ausência de qualquer ameaça identificável. Eles caracterizam-se por uma experiência súbita de intenso estresse, pensamentos catastróficos e ansiedade severa que se desenvolvem rapidamente, durando aproximadamente 10 min. Os principais sintomas dos AP na clínica são taquicardia, alterações cardíacas e respiratórias, dificuldade em respirar, sensação de sufocamento, dor no tórax, suor, vertigem, tremores, desejo de fuga e sensação de morte iminente (Freedman *et al.*, 1985; Stein *et al.*, 1992; Reclin *et al.*, 1994; Goetz *et al.*, 1994). A descrição clínica de Freud para o "ataque de ansiedade" já incluía 10 dos 13 sintomas necessários para o diagnóstico do TP quando este foi introduzido no Manual de Diagnóstico e Estatística de Desordens Mentais (DSM-III-R) (Frances *et al.*, 1993).

2. A matéria cinzenta periaquedutal como substrato para o Transtorno do Pânico

A matéria cinzenta periaquedutal (MCPA) é uma estrutura importante da região mesencefálica do cérebro de mamíferos. Ao contrário do prosencéfalo e do tronco cerebral, o mesencéfalo parece ter obtido poucas mudanças evolutivas. O formato da MCPA, por exemplo, varia pouco entre espécies. A aparência indiferenciada dessa estrutura e sua relativa estabilidade evolutiva sugerem que ela esteja envolvida em funções importantes de proteção e na regulação homeostática (Carrive, 1993).

Informações ascendentes e descendentes convergem na MCPA. Esta região recebe aferências diretas da medula espinhal e do núcleo do trigêmeo, o que indica um papel no processamento de estímulos somatossensoriais, provavelmente de natureza nociceptiva. Além disso, esta estrutura está conectada a uma série de regiões prosencefálicas que estão relacionadas ao comportamento emocional, como por exemplo, o córtex, amígdala, núcleo do leito da estria terminal e hipotálamo. Tais conexões sugerem que a MCPA participa na expressão dos estados emocionais. De fato, estudos neurofuncionais apontaram o envolvimento da mesma na analgesia e no comportamento defensivo (Carrive, 1993).

A MCPA é organizada em colunas morfofuncionais dispostas ao longo do aqueduto, quais sejam, colunas dorsomedial, dorsolateral, lateral e ventrolateral, e cada uma dessas formam uma coluna longitudinal que varia ao longo do eixo rostrocaudal. A marcação neuronal pela imunoreatividade da enzima sintetase do óxido nítrico (NOs) delimita a coluna dorsolateral da MCPA. Em níveis mais caudais, quando a MCPA assume uma forma trapezóide, a população de neurônios sensíveis a NOs se torna mais reduzida, dando espaço para a coluna ventrolateral (Onstott *et al.*, 1993) (Figura 1). A distinção entre as colunas lateral e ventrolateral é baseada em observações fisiológicas e comportamentais: enquanto a ativação dos neurônios laterais aumenta a atividade autonômica (simpática) e somatomotora, a ativação dos neurônios da coluna ventrolateral proporciona uma resposta inversa (Bandler *et al.*, 1991; Carrive, 1993; Morgan e Carrive, 2001). Embora não considerado como parte intrínseca da MCPA, o núcleo dorsal da rafe (NDR) situa-se na região ventromedial ao aqueduto e origina um grande contingente de projeções serotonérgicas ascendentes tanto para a MCPA e a amígdala, quanto para amplas áreas do prosencéfalo, incluindo o estriado e córtex préfrontal (Kosofsky and Molliver, 1987).

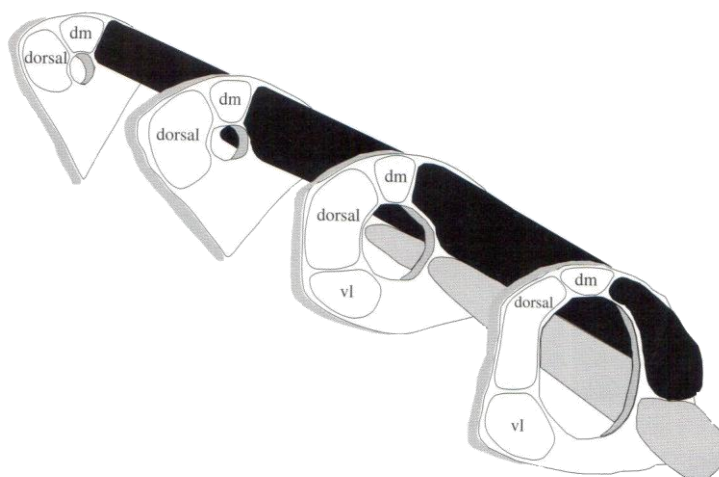


Figura 1: Organização colunar rostro-caudal das regiões dorsal e ventrolateral da matéria cinzenta periaquedutal (MCPA). dm, coluna dorsomedial da MCPA; vl, coluna ventrolateral da MCPA.

Mais importante para o presente estudo, as respostas produzidas pela estimulação elétrica ou química da MCPA têm sido propostas como um modelo de AP (Gentil, 1988; Jenck *et al.*, 1995; Deakin and Graeff, 1991; Schenberg *et al.*, 2001). De fato, muitos anos atrás, Nashold e colaboradores (1969) realizaram um estudo meticuloso mostrando que a estimulação intracraniana de humanos com eletrodos cronicamente implantados no teto do mesencéfalo produzia ansiedade, pânico, terror e sentimentos de morte iminente, acompanhados por sinais neurológicos e respostas viscerais que reproduzem os sintomas cardinais do AP (Tabela 1). O raio-X dos eletrodos mostrou que os sítios eficazes encontravam-se na metade dorsal da MCPA (MCPD), a qual compreende as colunas dorsomedial, dorsolateral e lateral desta estrutura (Keay e Bandler, 2004), mas não em sua metade ventral (MCPV) ou nas regiões adjacentes do teto do mesencéfalo. Mais recentemente, estudos com tomografia por emissão positrônica, mostraram que o pólo anterior do lobo temporal, o teto do mesencefalo e, possivelmente, a MCPD, são ativados durante os AP induzidos por lactato (Reiman *et al.*, 1989). Entretanto, em uma retratação posterior, Drevets e colaboradores (1992) sugeriram que a ativação dos lobos temporais daquele estudo havia sido devida a alterações do fluxo sanguíneo dos músculos faciais. Assim, embora

estes autores tenham utilizado a administração endovenosa de colecistocinina (CCK) para indução dos AP, os resultados acima sugerem que a MCPD é o melhor candidato a substrato neural destes ataques.

Tabela 1. Isomorfismo dos ataques de pânico e das respostas induzidas por estimulação da MCPD em homens e ratos (referências veja o texto).

	Ataques de pânico espontâneos ou induzidos por lactato em homens	Estimulação da MCPD em homens	Estimulação da MCPD em ratos
Sensações/comportamento	"bloqueio do andar" desejo de fugir intenso desconforto ansiedade severa pânico, terror sensação de morte iminente medo de ficar louco medo de perder o controle	n.d. interrupção do estímulo intenso desconforto ansiedade severa pânico, terror "medo de morrer" n.d. n.d.	congelamento fuga aversão --- --- --- --- ---
Respostas autonômicas	Taquipnéia hiperventilação dispnéia sensação de asfixia taquicardia ¹ hipertensão - - n.d. sudorese n.d.	n.d. hiperventilação apnéia respiração profunda taquicardia n.d. - - exoftalmia n.d. piloereção contralateral	taquipnéia hiperventilação n.o. respiração profunda taquicardia hipertensão micção defecação exoftalmia n.d. n.o.
Respostas neurológicas/Parestesias	sensação de tremor dor torácica sensação de calor/frio tonteira n.d.	sensação de vibração dor torácica e no coração sensação de calor/frio n.d. entorpecimento dor facial medial	--- --- --- --- ---
Áreas cerebrais estimuladas ou ativadas	MCPD, camadas profundas do colículo superior, amígdala (PET ²).	MCPD e teto adjacente (0-5mm lateral ao aqueduto) (raio-x).	MCPD, camadas profundas do colículo superior.

¹ Estudos recentes parecem contradizer o consenso anterior acerca da resposta taquicárdica; ² Tomografia por emissão positrônica. n.d. dado não disponível; n.o. dado não observado.

Em ratos, a estimulação da MCPD com estímulos de baixa magnitude, elétricos ou químicos, produz uma reação de congelamento caracterizada por imobilidade tensa e exoftalmia (protrusão do globo ocular e

abertura máxima das pálpebras), enquanto estímulos mais intensos dão origem a um comportamento vigoroso de fuga compreendendo galopes e saltos de 1m/s e 50 cm de altura, respectivamente (Bittencourt *et al.*, 2004; Schenberg *et al.*, 1993). Mais importante, a resposta de galope induzida pela estimulação da MCPD do rato foi seletivamente atenuada por panicolíticos clinicamente eficazes administrados em doses e regimes terapêuticos similares aos empregados na terapia do TP (Schenberg *et al.*, 2001, 2002; Vargas e Schenberg, 2001). Consequentemente, embora as respostas defensivas induzidas por estimulação da MCPD tenham sido indistintamente propostas como um modelo de AP (Gentil, 1988; Jenck *et al.*, 1995; Deakin and Graeff, 1991), as evidências farmacológicas sugerem que a resposta de galope seja o melhor representante desta síndrome (Schenberg *et al.*, 2001, 2005).

Notavelmente, o TP também difere dos transtornos de estresse. A teoria do estresse de Hans Selye (1936, 1950) teve um impacto enorme na prática médica e suas implicações foram intensivamente debatidas por quase um século. A marca fundamental da teoria é o conceito de inespecificidade da 'reação de alarme', isto é, a ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) que se segue à exposição aguda do organismo a uma variedade enorme de estressores, tanto físicos quanto psicológicos. Estudos posteriores mostraram que outros eixos hipotalâmicos-hipofisários também respondem ao estresse. Particularmente, demonstrou-se que a prolactina (PRL) é consistentemente liberada em resposta a um grande número de estressores (Neill, 1970; Siegel *et al.*, 1980; Dijkstra *et al.*, 1992). Consequentemente, a demonstração da ausência de ativação de respostas do eixo HPA e PRL após o estresse psicológico inquestionável de um AP aparece como um dos fatos mais intrigantes da psiquiatria contemporânea (Liebowitz *et al.*, 1984; Levin *et al.*, 1987; Hollander *et al.*, 1989a,b; Woods *et al.*, 1987a,b). De fato, numa revisão sobre este tópico, Graeff e colaboradores (2005) concluíram que nem os ataques de pânico da vida real, nem aqueles precipitados por panicógenos naturais (lactato e CO₂) ativam o eixo HPA. Contrariamente, panicógenos não-seletivos que produzem ansiedade antecipatória (ou estimulam o hipotálamo e a hipófise diretamente) aumentam a secreção dos hormônios do estresse. Mais importante, esta característica fornece uma pista preciosa para a compreensão

do substrato neural dos ataques de pânico. Neste sentido, demonstramos recentemente que os “hormônios do estresse”, corticotrofina (ACTH), corticosterona (CORT) e PRL não estão alterados nas respostas intensas de ativação emocional e exercício físico induzidas por estimulação da MCPD (Schenberg *et al.*, 2008). Contudo, Lim e colaboradores (2011) observaram aumentos expressivos da CORT 30 min após a respostas de fuga induzida por estimulação da MCPD. Como os últimos resultados podem ter sido devidos ao exercício muscular, estudos recentes de nosso laboratório avaliaram as respostas hormonais de ratos estimulados numa arena de 20 cm de diâmetro com intensidades que produziram a resposta de galope numa arena tradicional com 60 cm de diâmetro (Armini, 2012). Este procedimento produz a virtual abolição das respostas de fuga (Schenberg *et al.*, 2005). Ao contrário do observado nas respostas de fuga na arena grande, a estimulação na arena pequena não causou aumento algum dos níveis plasmáticos de lactato, confirmando a ausência de exercício muscular. Tampouco foram observadas respostas dos hormônios do estresse, corroborando os estudos anteriores. Estes resultados são indícios convincentes do envolvimento da MCPD na produção dos AP.

3. Papel da Serotonina no Transtorno do Pânico

Na atualidade, os inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRSs) são as drogas de primeira escolha no tratamento da maioria, ou até mesmo, de todos os transtornos de humor e ansiedade. Em vista deste fato, Deakin e Graeff (1991) sugeriram que a serotonina evoluiu como um neurotransmissor especializado no controle dos estados aversivos.

Contudo, o sistema serotoninérgico é extremamente complexo, possuindo mais de 14 tipos de receptores localizados pré- ou pós-sinápticamente, ou em ambas as estruturas. Além disto, a ativação destes receptores pode produzir efeitos opostos, dificultando a compreensão do papel deste sistema nos transtornos do humor e ansiedade (Hoyler *et al.*, 2002).

As primeiras evidências sobre o envolvimento da 5-HT na ansiedade foram obtidas em animais de laboratório submetidos a testes de conflito. Verificou-se que antagonistas ou depletors da 5-HT liberavam o comportamento alimentar suprimido por choque, efeito idêntico àquele dos ansiolíticos sinergistas do ácido gama-aminobutírico (GABA), tais como o etanol, barbitúricos e, principalmente, benzodiazepínicos (BDZ). Contrariamente, drogas que aumentavam a neurotransmissão serotoninérgica acentuaram a supressão comportamental (Graeff e Schoenfeld, 1970). De fato, estes autores mostraram que a alfa-metiltryptamina, um agonista do receptor da 5-HT, facilitou a supressão, enquanto a administração dos antagonistas metisergida e ácido bromolisérgico liberaram o comportamento punido. Como os BDZ reduzem a taxa de renovação da 5-HT, Stein e colaboradores (Wise *et al.*, 1972, 1973) sugeriram que este neurotransmissor era o mediador da punição e da inibição do comportamento em testes de conflito.

As vias serotoninérgicas ascendentes originam-se nos núcleos da rafe do mesencéfalo, onde se situam os corpos celulares dos neurônios serotoninérgicos, e se projetam para as estruturas corticais e límbicas do cérebro anterior, bem como para a MCPD. Segundo o modelo teórico desenvolvido por Wise e colaboradores (1972, 1973), a 5-HT exerceria uma ação frenadora do comportamento punido tanto em regiões prosencefálicas quanto na MCPA (*central gray*), nas quais exerceria um efeito ansiogênico (Figura 2).

Inesperadamente, no entanto, Schenberg e Graeff (1978) mostraram que a ciproheptadina, um antagonista de receptores 5-HT_{2A/2C}, facilitava a resposta de fuga (por pressão-à-barras) à estimulação aversiva da MCPD. O caráter aversivo da estimulação foi confirmado pelo efeito oposto de doses não-sedativas de clordiazepóxido, as quais aumentaram as latências de fuga ou até mesmo bloquearam estas respostas. Estudos nos quais ratos foram treinados a apertar uma barra para reduzir a intensidade da estimulação na MCPD em 5% (fuga decremental) levaram a resultados similares (Kiser e Lebovitz, 1975; Kiser *et al.*, 1978, 1980). Assim, a fuga decremental foi atenuada tanto pelo precursor da síntese (5-hidroxitriptofano) quanto pelo inibidor da recaptação (clomipramina) de 5-HT. Efeitos similares foram observados pela estimulação do núcleo dorsal da rafe (Kiser *et al.*, 1980). No

conjunto, estes resultados sugeriram que a 5-HT tem efeitos anti-aversivos na MCPD.

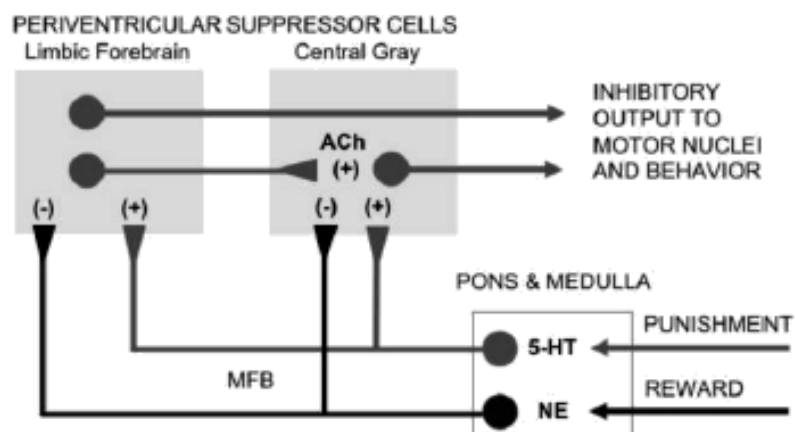


Figura 2. Diagrama ilustrando o presumível papel da serotonina (5-HT) e noradrenalina (NE) no modelo de punição de Wise, Berger e Stein (1973). De acordo com estes autores, os sinais de reforço positivo liberam o comportamento controlado por neurônios colinérgicos (ACh) nas áreas de supressão periventricular, através da ativação de NE proveniente principalmente dos núcleos pontinos (*locus coeruleus*). Por sua vez, os sinais de punição aumentam a supressão comportamental pela ativação dos neurônios 5-HT, provenientes dos núcleos da rafe. MFB, feixe prosencefálico medial (Schenberg, 2010).

Para explorar o modo de ação da 5-HT mais diretamente, Graeff e colaboradores conduziram uma série de experimentos com ratos implantados com quimitrodos que permitiam a estimulação elétrica concomitantemente à administração de drogas na MCPD. Os animais eram colocados em uma caixa de vaivém e a intensidade da corrente era gradualmente aumentada até que o rato apresentasse uma resposta de fuga para o compartimento oposto da caixa, desligando a estimulação intracraniana, considerando-se como o limiar aversivo a intensidade que produzisse 7 fugas em 10 tentativas. Após isso, a droga era microinjetada na MCPD e, dez minutos após, registrava-se seus efeitos sobre o limiar aversivo (Shutz *et al.*, 1985; Nogueira e Graeff, 1995; Graeff, 2004; Graeff and Zangrossi, 2010). Usando este procedimento, estes autores mostraram que enquanto a aplicação de 5-HT ou seus agonistas 5-MeODMT (5-metoxi-N,N-dimetiltriptamina) e DOI aumentavam os limiares

aversivos de maneira dose-dependente, a administração de antagonistas, tais como metergolina e quetanserina facilitavam a resposta de fuga. Contrariamente, a aplicação do mCPP, um agonista preferencial de receptores 5-HT_{2C}, foi ineficaz. Portanto, estes autores sugeriram que o efeito antiaversivo da 5-HT na MCPD era mediado pelos receptores 5-HT_{2A}. Estudos adicionais com agonistas de receptores 5-HT_{1A} (8-OH-DPAT e ipsapirona) sugeriram que estes também estavam envolvidos nos efeitos antiaversivos da 5-HT. Como os efeitos do 8-OH-DPAT e DOI foram bloqueados por antagonistas de receptores 5-HT_{1A} (NAN190) e 5-HT_{2A} (espiperona), Graeff e colaboradores concluíram que a fuga à estimulação da MCPA é modulada por ambos os tipos de receptores (Graeff, 1996; Graeff, 2004, 2012).

O labirinto-em-T elevado (LTE) também tem sido utilizado para a avaliação do papel da 5-HT nos comportamentos aversivos. O LTE é um equipamento com 2 braços abertos que se comunicam com um braço circundado por paredes. O LTE baseia-se na aversão natural que os ratos têm de espaços abertos e foi desenvolvido para permitir a medida, no mesmo animal, dos comportamentos de fuga ou esquiva inibitória dos braços abertos. Estudos farmacológicos sugerem que estas respostas assemelham-se ao pânico e ansiedade generalizada, respectivamente (Soares e Zangrossi, 2004; Pinheiro *et al.*, 2008; Pobbe *et al.*, 2010; Graeff, 2012).

Enquanto alguns estudos com LTE mostraram que a microinjeção de 5-HT na MCPD afeta ambas as respostas do LTE (Soares e Zangrossi, 2004), outros apresentaram evidências de que os receptores 5-HT_{2C} na MCPD estão preferencialmente envolvidos na regulação da ansiedade (esquiva inibitória), mas não no pânico (resposta de fuga) (Yamashita *et al.*, 2011). Adicionalmente, enquanto a fuga do braço aberto foi inibida pela administração tanto sistêmica como intracerebral de drogas que aumentam a ação da 5-HT, incluindo os antidepressivos eficazes na terapia do TP, ela foi facilitada pelos peptídeos panicogênicos CCK- α e CCK-4 administrados por via sistêmica e na MCPD, respectivamente. Notavelmente, o efeito panicolítico dos antidepressivos no LTE também foi antagonizado pelo pré-tratamento com um bloqueador de receptor 5-HT_{1A} na MCPD (Graeff, 2012).

No que se diz respeito à esquivia inibitória, Soares e Zangrossi (2004) mostraram que os receptores 5-HT_{1A} e 5-HT_{2A} têm funções opostas na MCPD. Assim, enquanto a ativação do primeiro teve um efeito ansiolítico, inibindo a aquisição da esquivia ao braço aberto, a ativação do segundo teve efeitos ansiogênicos. Estes autores também apresentaram evidências de que os receptores 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} e 5-HT_{2C} medeiam a ação inibitória da 5-HT na resposta de fuga do braço aberto, seja por uma ação inibitória nos neurônios de projeção da MCPD, ou por uma ação excitatória em interneurônios inibitórios, tal como foi sugerido por Brandão e colaboradores (1991).

A sensibilidade aos receptores 5-HT_{1A} e 5-HT_{2A} também foi intensificada pela administração crônica por 21 dias, mas não aguda, de panicolíticos tanto serotonérgicos (antidepressivos) como benzodiazepínicos (alprazolam) (Graeff, 2004; Pinheiro *et al.*, 2008; Graeff, 2012). Contudo, a ausência de efeito intracerebral dos antagonistas competitivos de receptores 5-HT_{1A} e 5-HT_{2A} no LTE torna improvável o envolvimento destes receptores na mediação fisiológica dos comportamentos de esquivia inibitória e fuga uma vez que a administração intra-MCPD de um antagonista de receptores 5-HT_{1A} (WAY-100635) não teve efeito nas respostas comportamentais do LTE na ausência de estimulação no NDR (Pobbe e Zangrossi, 2005). Similarmente, as microinjeções na MCPD de quetanserina e do SDZ-SER-082, antagonistas preferenciais de receptores 5-HT_{2C}, não tiveram efeito algum nos comportamentos de fuga ou esquivia inibitória (Soares e Zangrossi, 2004). Estes resultados sugerem que os receptores serotonérgicos na MCPD tenham um papel na regulação, mas não na geração, destes comportamentos. Esta função regulatória é executada pelo recrutamento de diferentes subtipos de receptores dependendo da tarefa defensiva a ser desempenhada. Mais especificamente, enquanto os receptores 5-HT₂ da MCPD medeiam os efeitos excitatório da esquivia inibitória (5-HT_{2C}) e inibitório da fuga do braço aberto (5-HT_{2A}), os receptores 5-HT_{1A} estão preferencialmente envolvidos na regulação da última resposta (Pobbe e Zangrossi, 2005). Além dos efeitos das drogas serotonérgicas na MCPD, os estudos no LTE mostraram que a estimulação de receptores 5-HT_{1A} e 5-HT_{2A} da MCPV causa efeitos do tipo ansiolítico,

prejudicando a aquisição da esquia inibitória sem alteração do comportamento de fuga (Soares e Zangrossi, 2009).

Em humanos, estudos de neuroimagem mostraram anormalidades da neurotransmissão serotoninérgica mesencefálica em pacientes com TP. O experimento mais pertinente foi conduzido por Maron e colaboradores (2004), que avaliaram a densidade do transportador de membrana de 5-HT (5-HTT) no cérebro de pacientes com TP por meio de tomografia computadorizada por emissão de fóton ("SPECT"). Pacientes com TP sintomático tiveram uma diminuição significativa da ligação do radioligante ao 5-HTT no mesencéfalo, lobos temporais e tálamo, quando comparados aos controles sadios. Contrariamente, pacientes sob tratamento tiveram índices normais de ligação no mesencéfalo e lobos temporais, mas não no tálamo no qual a taxa de ligação permaneceu reduzida. Os autores sugeriram que a redução na densidade do 5-HTT pode ter sido causada tanto por um déficit de 5-HT neuronal quanto por um processo compensatório para aumentar a disponibilidade de 5-HT sináptica. Como o déficit de 5-HTT no mesencéfalo e lobos temporais não foi observado nos pacientes tratados, ele pode estar relacionado aos sintomas clínicos. Por sua vez, a redução de 5-HTT no tálamo pode ser um indicador de ansiedade antecipatória devido ao aumento da sensibilidade interoceptiva (Graeff, 2012).

Adicionalmente, estudos *in vivo* de tomografia por emissão positrônica (TEP) mostraram uma redução da ligação específica para receptores 5-HT_{1A} tanto na rafe mediana quanto nas regiões anterior e posterior do giro cingulado dos pacientes com TP (Neumeister *et al.*, 2004). Como a MCPD recebe fibras serotoninérgicas do NDR, estas anormalidades podem resultar em mudanças funcionais dos neurônios que controlam os comportamentos defensivos.

Estes e outros estudos adicionaram novas evidências na hipótese proposta por Deakin e Graeff (1991). A hipótese Deakin/Graeff (HDG) supõe que a 5-HT exerça um papel duplo na modulação dos mecanismos de defesa processados por diferentes estruturas anatômicas (Figura 3). Esta hipótese originou-se com os estudos pioneiros de Schenberg e Graeff (1978) e Kiser e

colaboradores (1975, 1978, 1980) e consolidou-se com estudos posteriores de Graeff e colaboradores (Schutz *et al.*, 1985; para revisão, ver Graeff, 2004).

A HDG também se baseou nos estudos etológicos do casal Blanchard (Blanchard *et al.*, 1986), que elaboraram o conceito dos três níveis de defesa após análise das estratégias de defesa apresentadas por ratos selvagens diante de diferentes tipos de ameaças predatórias. O primeiro nível seria induzido por ameaça potencial, o animal depara-se com uma situação inédita, que pode envolver algum tipo de perigo, ou com uma situação onde vivenciou alguma ameaça no passado, porém não se acha mais presente. Nestas circunstâncias, a reação de defesa apresentada é a exploração cautelosa (*risk assessment*). No segundo nível, o rato já identificou o predador, porém este se encontra a uma distância maior que um limite crítico. Neste caso, verifica-se inibição comportamental, culminando em imobilidade tensa ou “congelamento”. Finalmente, no terceiro nível de defesa, o predador se encontra a uma distância inferior ao limite crítico ou já estabeleceu contato com a presa, a qual reage com ataque ou fuga (Graeff, 2003).

Deakin & Graeff sugeriram que nos casos de ameaça potencial, projeções serotoninérgicas do NDR à amígdala e ao córtex pré-frontal (CPF) facilitariam os comportamentos passivos de defesa (imobilidade e esquiva) tais como aqueles envolvidos na esquiva inibitória. Estes comportamentos seriam similares à ansiedade generalizada em humanos. Para isto, as projeções serotoninérgicas inibitórias do NDR à MCPD inibiriam as respostas ativas da fuga, as quais estariam relacionadas ao pânico (Graeff, 2003; Pobbe e Zangrossi, 2005; Pobbe *et al.*, 2010; Graeff e Zangrossi, 2010; Graeff, 2012). Considerando que as projeções 5-HT oriundas do NDR inervam tanto a amígdala como a MCPD, foi proposto por Deakin e Graeff que a 5-HT facilita a defesa proximal ou distal na amígdala, enquanto inibe a defesa proximal na MCPD. O sentido adaptativo desta organização seria o de impedir reações intempestivas de fuga que tornariam a presa mais conspícua, quando a ameaça fosse apenas potencial ou distal (Graeff, 2003). A implicação clínica mais importante da HDG seria que a 5-HT facilitaria a ansiedade, mas inibiria o pânico. Logo, enquanto o déficit de 5-HT na MCPD poderia predispor o TP, a intensificação da neurotransmissão serotoninérgica desta região poderia estar

implicada na ação antipânico dos medicamentos antidepressivos. Em suma, a hipótese serotoninérgica da fisiopatologia do TP propõe que pacientes de pânico possuem deficiência da inibição serotoninérgica nos neurônios localizados na MCPD, estrutura que organiza reações defensivas para lidar com ameaças proximais (Graeff, 2012).

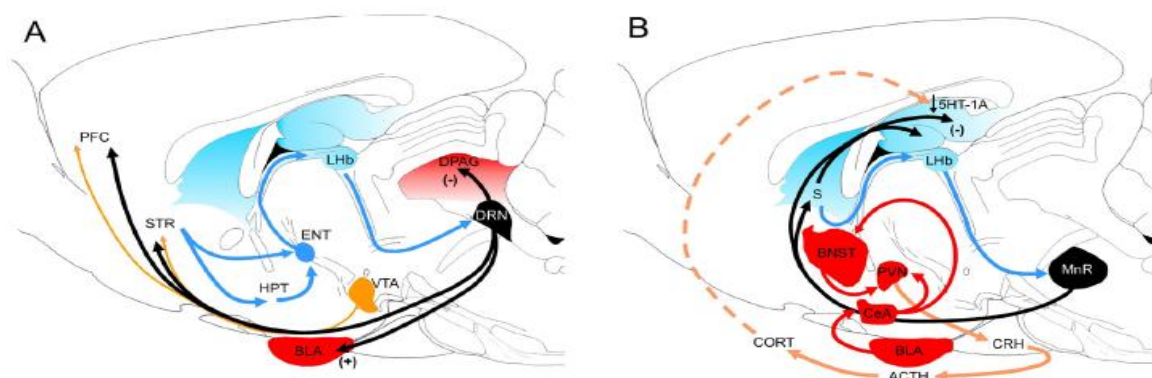


Figura 3: Modelo da hipótese de Deakin e Graeff no cérebro de rato: A) Deakin e Graeff (1991) sugeriram que enquanto o transtorno da ansiedade generalizada é produzido pela supra-atividade das projeções excitatórias serotoninérgicas (5-HT) provenientes do núcleo dorsal da rafe (DRN) (setas pretas) para áreas do córtex pré-frontal (PFC) e amígdala (BLA), as quais processam ameaça distal, o ataque de pânico é uma disfunção das projeções inibitórias de 5-HT na matéria cinzenta periaquedutal dorsal (DPAG), desse modo liberando a resposta a ameaças proximais, medo inato ou anóxia. Por sua vez, o conflito da ansiedade é o resultado da atividade simultânea das projeções de 5-HT do DRN e das projeções dopaminérgicas provenientes da área tegmentar ventral (VTA), que se projetam para o estriado (STR), e medeiam os comportamentos de esquiva e aproximação, respectivamente. B) Deakin e Graeff (1991) também propuseram que as eferências 5-HT que se projetam do núcleo mediano da rafe (MnR) ao hipocampo, sejam o substrato do "sistema de resiliência comportamental", que é responsável pelo equilíbrio dos eventos estressores das rotinas diárias. Os níveis aumentados de glicocorticóides (CORT) dessensibilizaria os receptores 5-HT_{1A} no hipocampo, levando ao surgimento do desamparo aprendido e depressão. Note a localização central da habênula lateral (LHb) na regulação das atividades do DRN e do MnR. BLA, amígdala basolateral; BNST, núcleo do leito da estria terminal; CeA, amígdala central; CRH, hormônio liberador de corticotrofinas; HPT, hipotálamo; ENT, núcleo entopeduncular (pálido interno); PVN, núcleo paraventricular do hipotálamo; S, septum (Schenberg, 2010).

Além da dupla função da 5-HT nos comportamentos de pânico e ansiedade, Deakin & Graeff (1991) propuseram que os estados depressivos são devidos à subregulação de receptores 5-HT_{1A} no hipocampo, uma região que recebe uma proeminente inervação do núcleo mediano da rafe (NMR). Neste modelo, o hipocampo é a estrutura central de um 'sistema de resiliência' que separaria as tarefas do dia-a-dia dos eventos aversivos, permitindo o controle das situações estressantes (Figura 3). Esta hipótese baseia-se em achados anteriores mostrando que os receptores 5-HT_{1A} do hipocampo são subregulados tanto pela exposição prolongada ao estresse (isolamento social) quanto pela administração de corticosterona. O déficit na neurotransmissão 5-HT_{1A} do hipocampo produzido pelos níveis elevados de corticóides do estresse prolongado seria a base do desenvolvimento tanto do desamparo aprendido (*learned helplessness*) (DA) em animais quanto da depressão em humanos. Os antidepressivos agiriam restaurando a neurotransmissão mediada pelo receptor 5-HT_{1A} (Deakin e Graeff, 1991).

4. Comorbidade dos Transtornos Ansiosos e Depressivos com Transtorno do Pânico

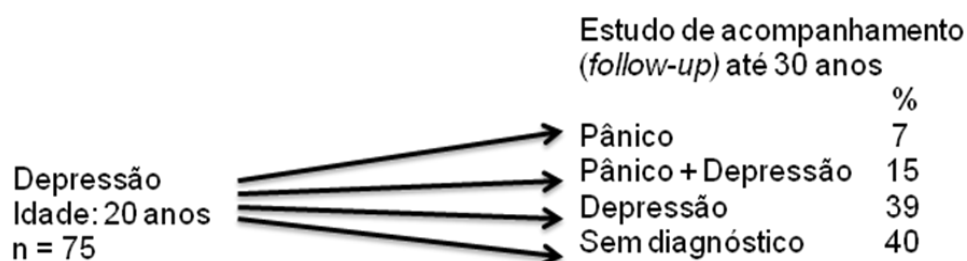
Estudos clínicos e epidemiológicos mostraram que existe uma alta comorbidade entre depressão, ansiedade e TP, com ou sem agorafobia. Adicionalmente, alguns autores sugerem que a comorbidade do TP e agorafobia só é observada quando o pânico está associado à depressão (Thompson *et al.*, 1989; Angst e Wicki, 1993). Estudos de acompanhamento (*follow-up*) baseados em entrevistas clínicas mostraram que somente 7% dos pacientes que apresentaram depressão aos 20 anos de idade desenvolverão o TP nos 10 anos subseqüentes. Estes estudos também mostraram que a depressão somente é agravada por TP em 15% dos pacientes (Figura 4-A).

Angst e Wicki (1993) também observaram que o diagnóstico de TP apresentou flutuações significativas ao longo de 10 anos de acompanhamento de pacientes que apresentavam TP simples (*uncomplicated*) aos 20 anos de idade. De fato, enquanto 54% destes pacientes apresentaram

remissões completas do pânico e da depressão, 31% desenvolveram apenas transtornos depressivos e 15% tiveram TP agravado pela depressão (Figura 4-B).

Angst e Wicki (1993) também mostraram que 41% e 95%¹ dos pacientes com TP desenvolveram depressão no ano seguinte ou ao longo dos 10 anos subseqüentes, respectivamente. Portanto, o TP simples é uma condição raramente encontrada na clínica.

A



B

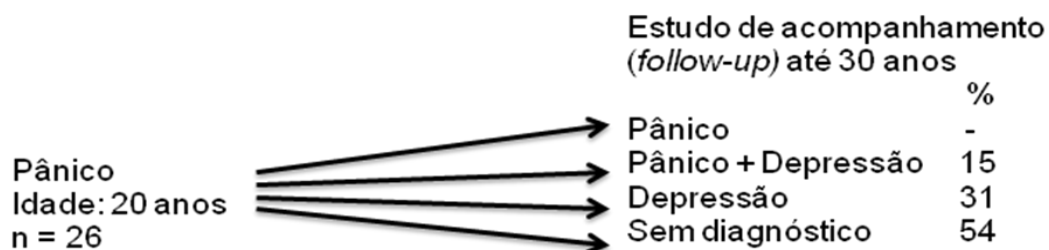


Figura 4. Estudos longitudinais da comorbidade do transtorno do pânico e depressão. A) pacientes diagnosticados como depressivos aos 20 anos de idade, B) pacientes com diagnóstico de transtorno de pânico simples (*uncomplicated panic disorder*) aos 20 anos de idade (modificado de Angst e Wicki, 1993).

¹ Note que no artigo original a soma dos valores da Tabela 2.7 foi calculada erroneamente como sendo de 79%.

Pacientes com TP e depressão também apresentam ataques mais severos de pânico e um risco maior de suicídio (Jonhson e Lyard, 1998; Lecrubier, 1998; Lecrubier e Ustun, 1998; Kaufman e Charney, 2000).

Por outro lado, evidências clínicas sugerem que a ansiedade de separação na infância (ASI), bem como a perda social são fatores predisponentes tanto da depressão quanto do TP (Klein and Fink, 1962; Roy-Byrne *et al.*, 1986, 2000; Zeanah, 1988; Faravelli and Pallanti, 1989; Klein, 1993; Klein, 1995; Battaglia *et al.*, 1995; Kaunonen *et al.*, 2000; Milrod *et al.*, 2004; Preter and Klein, 2008). Esta possibilidade é intrigante uma vez que a ASI e o TP são quadros clínicos bastante distintos (Klein, 1995).

A ASI foi primeiramente proposta nos relatos da teoria do apego, apresentado por John Bowlby (1983). Este pesquisador sugere que o relacionamento afetuoso, íntimo e próximo, da mãe ou da figura-materna, na primeira infância (1 a 3 anos de idade), favorece o desenvolvimento de uma personalidade saudável. Ao contrário, a ausência do cuidado materno resultaria em ansiedade de separação da infância (*childhood separation anxiety*), levando ao desenvolvimento de apego ansioso (*anxious attachment*) e “personalidade insegura” no adulto (Ainsworth e Bowlby, 1991; Bowlby, 1983; Bretherton, 1992), os quais seriam fatores predisponentes de diversos transtornos psiquiátricos, inclusive, fobia e pânico (Bowlby, 1983; Manicavasagar *et al.*, 2009; Klein, 1995).

Existem provas convincentes de que experiências estressantes na infância, tais como negligência, perda dos pais ou abuso físico ou sexual, sejam fatores de risco importantes para o desenvolvimento da depressão na vida adulta (Canneti *et al.*, 1997; McCauley *et al.*, 1997; Repetti *et al.*, 2002; Heim e Nemeroff, 2001; Widom *et al.*, 2007). Uma abordagem amplamente aceita sugere, portanto, que a combinação de fatores genéticos, experiências estressantes da infância e estresse por períodos prolongados determinam a resposta do indivíduo a situações novas de estresse e sua vulnerabilidade aos transtornos psiquiátricos, incluindo o TP (Charney e Manji, 2004).

De fato, o estudo pioneiro de Klein e Fink (1962) relatou que 50% dos pacientes agorafóbicos hospitalizados haviam apresentado ASI severa que

muitas vezes impediu o comparecimento à escola. Estes achados foram confirmados por Rachel G. Klein (1995) num estudo de acompanhamento ao longo de 15 anos de 54 pré-adolescentes que apresentavam recusa escolar e 60 controles. Este estudo tem especial importância na medida que foi baseado em entrevistas clínicas conduzidas por profissionais que desconheciam o histórico dos pacientes. Os resultados mostraram que o TP foi a única condição psiquiátrica estatisticamente significativa nos pacientes que sofreram de ASI (7% nos probandos versus 0% nos controles). Este índice também foi maior que a prevalência de TP em adultos, estimada entre 1,2 a 2-3% (Angst e Wicki, 1993). Contudo, Klein (1995) também observou uma tendência ($p < 0,10$) para o desenvolvimento da depressão maior e uma incidência significativamente mais elevada de hospitalizações ($p < 0,02$), principalmente, devidas a episódios depressivos dos probandos (14%) quando comparados aos controles (1,7%). Por fim, a relação entre ASI e TP também foi sugerida pela eficácia do pânico-imipramina na primeira condição (Klein, 1992, Bernstein *et al.*, 2000). Em conjunto com a teoria de apego proposta por Bowlby (1983), estas observações influenciaram a compreensão atual da importância dos transtornos da infância no desenvolvimento ulterior dos transtornos de ansiedade.

De fato, Pine e colaboradores (2000; 2005) mostraram uma relação significativa entre ASI e desregulação respiratória na vida adulta, um sintoma do TP. A hipersensibilidade respiratória à inalação de 5% de CO₂ foi significativamente maior nas crianças com ASI e, em menor grau, no TAG, que nas crianças com fobia social. Estes dados estão de acordo com a hipótese do alarme falso de sufocamento (Klein, 1993) e, principalmente, com a extensão desta teoria (Preter e Klein, 2008; Preter *et al.*, 2011) que sugere que o TP e a ASI estão relacionados a uma anormalidade dos mecanismos opióides envolvidos tanto nos mecanismos respiratórios quanto nas relações parentais. De fato, Preter e colaboradores (2011) mostraram que voluntários sadios pré-tratados com naloxona apresentaram resposta respiratórias similares aos ataques de pânico à infusão intravenosa de lactato de sódio.

Estas observações clínicas são apoiadas por experimentos em ratos que mostraram que a privação materna anterior ao desmame potencia a

resposta do eixo HPA (Walker *et al.*, 1986) e condiciona o desenvolvimento das respostas endócrinas e comportamentais ao estresse na vida adulta (Rots *et al.*, 1996). Adicionalmente, este procedimento leva a mudanças comportamentais no rato adulto que são similares aos aspectos centrais da depressão em humanos (Matthews e Robbins, 2003; Ruedi-Bettschen *et al.*, 2006; Uchida *et al.*, 2010; Baek *et al.*, 2011). Em particular, Matthews e Robbins (2003) mostraram que a separação materna reduz o comportamento de autoestimulação com estímulos intracranianos, sugerindo o desenvolvimento de anedonia. A influência predisponente da privação materna no desenvolvimento de comportamentos depressivos em ratos adultos também é apoiada pela eficácia dos ISRSs na atenuação destes comportamentos (Ruedi-Bettschen *et al.*, 2006; El *et al.*, 2006). Contudo, não foram observadas diferenças no tempo de imobilidade da natação forçada, um índice de depressão, nos animais privados quando comparados aos controles (Wigger e Neumann, 1999).

O estresse neonatal também pode estar envolvido no desenvolvimento da ansiedade na vida adulta. De fato, vários estudos relataram que ratos submetidos à privação materna ao longo do período de amamentação apresentaram níveis elevados de ansiedade quando adultos (Wigger e Neumann, 1999; Huot *et al.*, 2001; Rentesi *et al.*, 2010). Contrariamente, no entanto, outros laboratórios mostraram que os índices de ansiedade não estão alterados (Slotten *et al.*, 2006; Hulshof *et al.*, 2011; Quintino dos Santos, 2012), ou são até mesmo reduzidos (Roman *et al.*, 2006), nos ratos submetidos a este procedimento. Os resultados contraditórios podem ter sido devidos à diversidade dos procedimentos de privação materna, principalmente, quanto ao modo da separação (isolamento de um único filhote ou de toda a ninhada), mas também quanto à frequência e período pós-natal da separação materna e controles da temperatura e comunicação auditiva, visual ou olfativa com a mãe, dentre outros fatores. De fato, enquanto períodos curtos (3-15 min) de separação materna reduziram as respostas comportamentais e endócrinas aos estressores na idade adulta (Meaney *et al.*, 1992; 1996), períodos prolongados (3-6 h) aumentaram estas respostas (Plotsky e Meaney, 1993; Van Oers *et al.*, 1998; Francis e Meaney, 1999).

Além do tempo de contato entre mãe e filhote (Meaney, 2001), existem outros fatores que podem influir nos resultados. Por exemplo, Hofer (1996) relatou que dentre inúmeras variáveis que foram combinadas em complexidade crescente (textura, temperatura dos filhotes, do ambiente ou da mãe, propriedades de objeto substitutivo da mãe, etc.), um pequeno “tapete” de pelo sintético foi a única variável que, isoladamente, reduziu a vocalização dos filhotes privados. Adicionalmente, a variabilidade dos resultados também pode ter sido devida à diversidade dos modelos de avaliação de ansiedade experimental (Lehman e Feldon, 2000).

Em todo caso, os estudos acima levantam a questão se os modelos de depressão e ansiedade experimental alteram os ataques de pânico induzidos por estimulação da MCPD. Neste sentido, estudos recentes do nosso laboratório (Quintino dos Santos, 2011) mostraram que ratos submetidos ao isolamento social neonatal (ISN) por 3 h diárias ao longo de todo período de amamentação (20 dias) não apresentaram diferenças significativas nos índices de ansiedade (labirinto-em-cruz elevado) ou depressão (natação forçada) quando comparados aos irmãos que permaneceram com a mãe. Notavelmente, no entanto, os ratos privados apresentaram reduções acentuadas nos limiares dos comportamentos de imobilidade, exoftalmia, trote, galope e salto produzidos pela estimulação elétrica da MCPD 45 dias após o desmame (Quintino dos Santos, 2011). Este estudo é a primeira evidência em animais da influência facilitatória da ASI nos ataques de pânico. Adicionalmente, estes dados sugerem que o ISN produz alterações permanentes dos circuitos intrínsecos ou eferentes da MCPD, uma vez que os efeitos comportamentais foram observados 45 dias após o período de privação materna. No mesmo sentido, este autor observou que os comportamentos de defesa da MCPD estão facilitados nos ratos adultos bulbectomizados na juventude, um modelo de depressão causado por fatores endógenos, tal como parece ser o caso da depressão maior. Por fim, Quintino dos Santos (2011) também avaliou os comportamentos de defesa de ratos que foram submetidos ao protocolo do desamparo aprendido (DA), um modelo experimental de depressão reativa (transtorno de ajustamento com depressão). Ao contrário dos ratos submetidos à privação materna, o DA causou aumentos progressivos

dos limiares das respostas de defesa 2 e 7 dias após o término da aquisição deste procedimento.

Embora os mecanismos neurais da comorbidade do pânico e transtornos da ansiedade e depressão permaneçam completamente desconhecidos, os estudos acima abrem a possibilidade do seu estudo em animais. Por outro lado, os ISRSs são as drogas de primeira escolha no tratamento da maioria dos transtornos de ansiedade e depressão, incluindo o pânico, depressão, ansiedade e transtornos obsessivos. Assim, o presente estudo avaliou os efeitos do ISN e do DA nos níveis teciduais de 5-HT da metade dorsal e da coluna ventrolateral da MCPA

.OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito do ISN e do DA no metabolismo da serotonina (5-HT) na MCPA de ratos adultos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar os níveis tissulares de 5-HT e do seu principal metabólito, o ácido 5-hidróxindolacético (5-HIAA), bem como a taxa de renovação de 5-HT, na matéria cinzenta periaquedutal dorsal e ventrolateral de ratos adultos submetidos ao ISN.
2. Avaliar os níveis tissulares de 5-HT e do seu principal metabólito, o ácido 5-hidróxindolacético (5-HIAA), bem como a taxa de renovação de 5-HT, na matéria cinzenta periaquedutal dorsal e ventrolateral de ratos adultos submetidos ao DA.

ESTUDO I:

**EFEITOS DO ISOLAMENTO SOCIAL NEONATAL PARCIAL NO
METABOLISMO DA SEROTONINA NA MATÉRIA CINZENTA
PERIAQUEDUTAL DORSAL E VENTROLATERAL DO RATO**

RESUMO

Dados clínicos sugerem que a ansiedade de separação na infância (ASI) predispõe o transtorno do pânico (TP) na vida adulta. De fato, os ataques de pânico induzidos por estimulação da matéria cinzenta periaquedutal (MCPA) de ratos foram facilitados pelo isolamento social neonatal (ISN), um modelo de ASI. Evidências abundantes sugerem, por outro lado, que a serotonina (5-HT) esteja profundamente envolvida nos transtornos de ansiedade e depressão. Portanto, o presente estudo examinou os efeitos do ISN sobre os níveis tissulares de 5-HT e seu principal metabólito (5-HIAA), bem como sobre a taxa de renovação de 5-HT (TR-5HT), nas regiões dorsal (MCPD) e ventrolateral (MCPVL) da MCPA. O ISN foi realizado por 3 horas diárias ao longo do período de amamentação (PN2-PN21). Para isto, os ratos eram transferidos para caixas novas sozinhos (P, n=12) ou acompanhados de suas mães (NP, n=13). Quando adultos (PN60-PN65), eles eram decapitados para remoção do cérebro e dissecação da MCPD e MCPVL para análise histoquímica por cromatografia de alto desempenho (HPLC). Os resultados foram comparados a controles virgens (VG, n=12). Embora os grupos P e NP tenham apresentado aumentos significativos nos níveis de 5-HT e na TR-5HT em relação ao grupo VG, não foram observadas diferenças significativas nos níveis de 5-HT e 5-HIAA, ou na TR-5HT, entre os grupos NP e P, tanto na MCPD quanto MCPVL. Estes resultados sugerem que o ISN não tem efeitos diferenciados sobre o metabolismo serotoninérgico da MCPA. É necessário, no entanto, examinar os eventuais efeitos do ISN na expressão dos receptores 5-HT.

INTRODUÇÃO

A ansiedade de separação na infância (ASI) é um transtorno no qual a separação da criança da figura de apego (mãe ou substituta) é acompanhada de ansiedade excessiva (APA, 2000). A síndrome foi descrita como um conjunto de sintomas e comportamentos que refletem a ativação de um sistema de alarme para proteção da criança de rupturas reais, ou potenciais, dos laços familiares (Bowlby, 1983; Gittelman-Klein, 1995).

Por outro lado, Donald Klein (1993) propôs que o transtorno de pânico (TP) está relacionado ao medo produzido pelo disparo falso de um sistema de alarme de sufocamento. Klein (1993) argumenta que esta hipótese é consistente com a hipersensibilidade destes pacientes à infusão endovenosa de lactato de sódio e inalação de CO₂, dentre outros sintomas respiratórios.

A hipótese de que a ASI favorece o TP em adultos foi primeiramente formulada no estudo de Donald Klein (1964) após observar que 50% dos agorafóbicos hospitalizados foram crianças ansiosas e dependentes que, tipicamente, não compareciam à escola (*school refusal*). De forma similar, Souza (1996) relatou que 22 (32%) de 68 pacientes com TP preencheram os critérios para diagnóstico de ansiedade de separação na infância ou adolescência. Assim, enquanto Silove e colaboradores (1996) sugeriram que a ASI relaciona-se preferencialmente ao pânico, mas não à agorafobia, Kagan e colaboradores (1988) propuseram que os pacientes com TP desenvolvem primeiro a ASI e, em seguida, fobia social na adolescência e TP na idade adulta.

De fato, num estudo duplo-cego de acompanhamento (*follow-up*) por 15 anos de 54 pré-adolescentes com recusa escolar e 60 controles saudáveis, Rachel Guittelman-Klein (1995) mostrou que o TP foi a única condição psiquiátrica estatisticamente significativa nos adultos que sofreram de ASI (7% nos probandos versus 0% nos controles). Adicionalmente, houve uma tendência mais elevada ($p < 0,10$) para o desenvolvimento de depressão maior e um número maior de hospitalizações ($p < 0,02$) dos probandos devida,

principalmente, aos episódios depressivos (14% versus 1,7%). Por fim, a “hipótese da ansiedade de separação” também é apoiada pela eficácia comprovada da imipramina tanto no TP quanto na ASI (Bernstein *et al.*, 2000; Gittelman-Klein and Klein, 1973).

A influência da ASI na etiologia do TP também foi sugerida por estudos pré-clínicos que mostraram que ratos submetidos ao isolamento social neonatal (ISN), um modelo de ASI, apresentam uma facilitação sexo-dependente das respostas respiratórias à hipóxia (machos) e hipercapnia (fêmeas) na vida adulta (Genest *et al.*, 2004; 2007a,b; Dumont e Kinkead, 2010).

Embora os sistemas de alarme de separação e sufocamento permaneçam desconhecidos, a estimulação elétrica da metade dorsal da matéria cinzenta periaquedutal (MCPD) produz emoções aversivas em humanos (Nashold *et al.*, 1969) e comportamentos defensivos em animais (Bittencourt *et al.*, 2004) que têm sido propostos como um modelo de ataque de pânico (Gentil, 1988; Jenck *et al.*, 1995; Deakin and Graeff, 1991; Schenberg *et al.*, 2001; Schenberg, 2010; Schimitel *et al.*, 2012). De fato, evidências recentes em animais sugerem que a MCPD abriga um sistema de alarme de sufocamento sensível à hipóxia cuja ativação torna os indivíduos hiperreativos à hiperapnia (Schimitel *et al.*, 2012). Mais importante para o presente estudo, a MCPD também pode estar envolvida no efeito facilitatório da ASI no TP. Assim, dados recentes no nosso laboratório mostraram que os comportamentos de defesa à estimulação da MCPD estão facilitados nos ratos que foram submetidos ao ISN (Quintino dos Santos, 2011). Contudo, os mecanismos neuroquímicos destes efeitos permanecem completamente obscuros. Por outro lado, evidências abundantes tanto clínicas quanto experimentais sugerem que a serotonina (5-HT) seja um neurotransmissor fundamental nos transtornos de ansiedade, pânico e depressão (Deakin e Graeff, 1991). Assim, o presente estudo avaliou o metabolismo da 5-HT nas regiões dorsal e ventrolateral da MCPA de ratos machos adultos que sofreram o procedimento ISN.

MATERIAIS E MÉTODOS

ANIMAIS

Ratas Wistar, prenhas, primíparas, fornecidas pelo biotério do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, foram mantidas numa sala com temperatura controlada de aproximadamente 23°C e ciclo claro-escuro (12 X 12 h, luzes acesas às 6:00 h). As ratas foram alojadas individualmente em gaiolas de polietileno medindo 49 cm X 34 cm X 16cm (caixa ninho), com água e comida à vontade. Também foram usados ratos adultos (VG), virgens de qualquer manipulação, pesando entre 230 – 270 g. Estes animais foram alojados em caixas individuais de polipropileno (30 cm X 20 cm X 13 cm) e assoalho coberto com serragem com livre acesso à água e comida e mantidos sob as mesmas condições ambientais que as ratas prenhas.

Os procedimentos foram aprovados e realizados de acordo com o comitê de ética no uso de animais (CEUA-UFES PROTOCOLO 096/2011).

PROCEDIMENTOS

Privação materna

Neste estudo foram utilizados 25 animais, dos quais 12 foram submetidos à privação materna (P) e 13 permaneceram com as mães (NP), de PN2 até PN21 (Tabela 1).

Tabela 2. Etapas do experimento de privação materna. PN – dia pós-natal.

PN1	PN2-PN21	PN60
Sexagem	Privação Materna	Preparação da amostra

No 1º dia pós-natal (PN1) foi feita a sexagem para a padronização das ninhadas (máximo de 8 animais), permanecendo somente os machos com suas respectivas mães até o desmame (PN21). Em PN2 os filhotes foram marcados no dorso com uma caneta dermográfica (Texta Fineline 700) para a distinção do grupo P. Durante o procedimento de privação materna, os ratos P foram acomodados individualmente em caixas de separação (30 cm X 20 cm X 13 cm) e os ratos NP foram transportados com a mãe para uma nova caixa ninho, doravante chamada caixa controle. Adicionalmente, o cheiro e a comunicação com a mãe foram atenuados colocando-se as caixas de separação num compartimento fechado (49 cm X 66 cm X 96 cm) com uma pequena abertura para ventilação (10 cm X 10 cm).

A privação materna foi realizada pela separação dos filhotes por 3 horas, numa janelas entre 8:00 h ao 12 h, de PN2 a PN21. Ao término das sessões de privação, os animais foram retornados para a caixa ninho. O grupo NP foi manipulado de forma similar durante o transporte com as mães para a caixa controle e o retorno para a caixa ninho. Após o desmame, os ratos P e NP foram alojados em suas respectivas gaiolas, em grupos de 2 a 4 animais, com água e comida *ad libitum*.

Coleta das amostras de tecido da MCPA

Entre PN60 e PN65, os animais eram pesados e sacrificados por decapitação, removendo-se o cérebro rapidamente para preparação das amostras da MCPD e MCPVL. Para isto, o cérebro era colocado num suporte, de fabricação própria (Figuras 5 e 6, ver Anexo), para realização de secções

coronais de 1 mm de espessura. Eram feitas 3 a 4 secções da MCPA (Figura 7) entre as coordenadas aproximadas de 7,3 mm e 8,3 mm posteriores ao bregma (Paxinos e Watson, 1998). As fatias eram imediatamente estendidas sobre um papel de filtro apoiado numa placa de Petri resfriada em gelo (Figura 8, ver Anexo). Uma lâmina de plástico preto era colocada entre o papel e a placa de Petri, aumentando o contraste das estruturas cerebrais e os cortes eram umedecidos com líquido cérebro-espinhal artificial (NaCl 120mM, KCl 5mM, MgCl₂ 4 mM, Glicose 25 mM e HEPES 20 mM). As áreas identificadas como MCPD (colunas dorsomedial, dorsolateral e lateral da MCPA) (Figura 9, ver Anexo) e MCPVL (coluna ventrolateral da MCPA) (Figura 10, ver Anexo) eram totalmente removidas com auxílio de uma lupa de pequeno aumento (Figura 11, ver Anexo) e um perfurador de aço inoxidável feito com um segmento de cateter intravenoso (Embramac, 14G x 2, Itajaí, Brasil), com diâmetros externo e interno de 2,1 e 0,6 mm, respectivamente (Figura 12, ver Anexo). A parede da extremidade da cânula era afiada e polida para cerca de 0,2 mm de espessura para picotar (*to punch out*) a MCPA sem perda significativa de tecido. Em seguida, utilizava-se o mandril do próprio cateter para extração do tecido do interior da agulha. As amostras eram pesadas e, em seguida, congeladas num *ultrafreezer* à temperatura de -80°C até a realização da análise bioquímica.

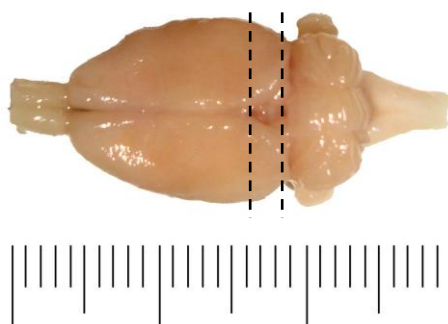


Figura 7. Limites aproximados do bloco seccionado para coleta de amostras.

Análise dos níveis tissulares de 5-HT, 5-HIAA e da TR-5HT da MCPA

Cerca de 30 dias após o armazenamento das amostras, as mesmas foram transportadas em gelo seco para o Laboratório de Neurociência Comportamental e Molecular (LaNeC) localizado na Faculdade de Filosofia e Ciências Humanas (Fafich) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

As amostras eram homogeneizadas em tubo “potter” com 290 μ l de ácido perclórico (HClO_4 0,1 M), 5 μ l de ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA 0,1 mM) e 5 μ l de metabisulfito de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ 0,4 mM). A seguir, elas eram centrifugadas a 4°C com velocidade angular de 10 000 rpm por 30 min. O sobrenadante das amostras individuais (200 μ l) era colocado num tubo mantido entre 0°C e 4°C até ser analisado por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Para isto, utilizou-se um equipamento HPLC Shimadzu (LC-10AD, Tokyo, Japão) com alças de 200 μ l e 10 μ l (Rheodyne 7725-I, California, USA) e detector eletroquímico com eletrodo de carbono vítreo (Shimadzu L-ECD-6A) acoplado à bomba de pressurização (Shimadzu LC-10). A cromatografia foi feita com uma coluna analítica C18 (Hibar-Futigsanle RT) com partículas de 3 μ m (150 mm X 4,6 mm, ID). Um integrador (Shimadzu C-R7 Ae plus) foi utilizado para analisar os dados cromatográficos. A fase móvel consistiu de uma solução de 0,194 M de ácido cítrico monohidratado, 0,243 M de acetato de sódio trihidratado e $2,95 \times 10^{-4}$ M de EDTA, num volume final de 500 ml. O fluxo da bomba foi de 1,0 ml/min, e o potencial do eletrodo de 0,85 V. As concentrações tissulares de 5-HT e do seu principal metabólito, 5-HIAA, foram calculadas por interpolação das respectivas curvas padrão. Os valores obtidos foram expressos em ng/g de tecido úmido. O cociente 5-HT/5-HIAA foi usado como índice da taxa de renovação da 5-HT (*turn over*) (Oliveira *et al.*, 2010).

Análise estatística

As concentrações (ng/g) de 5-HT e 5-HIAA foram convertidas em logaritmos. A taxa de renovação foi calculada como $\text{Log}[5\text{-HT}]/\text{Log}[5\text{-HIAA}]$. Após a exclusão dos valores extremos (*outliers*), ao nível de significância de

5%, pelo critério do resíduo normal máximo (*maximum normed residual*) (Snedecor and Cochran, 1982), os valores foram submetidos à análise de variância (ANOVA) de duas vias (tratamento x região da MCPA) seguida de comparações múltiplas segundo o critério de 5% de Bonferroni. A análise foi feita pelo programa Statistical Analysis System (SAS[®], Cary, EUA).

RESULTADOS

Efeito da privação materna sobre o peso corporal. Entre PN60 e PN65, não houve diferença significativa no peso corporal dos ratos privados ($316,7 \pm 14,8$) e não-privados ($332,3 \pm 10,6$) (média \pm EPM).

Efeito da privação materna nos níveis de 5-HT, 5-HIAA e na TR-5HT na matéria cinzenta periaquedutal dorsal e ventral. Os grupos apresentaram diferenças altamente significantes quanto aos níveis de 5-HT ($F_{5,63} = 13,23$; $p < 0,0001$). Estas diferenças foram exclusivamente devidas aos tratamentos ($F_{2,63} = 32,14$; $p < 0,0001$). Assim, comparados aos controles intactos (VG), os níveis de 5-HT foram significativamente maiores nos grupos P ($t = 4,9$; $p < 0,0001$) e NP ($t = 4,46$; $p < 0,0001$) da MCPD, e P ($t = 5,2$; $p < 0,0001$) e NP ($t = 5,1$; $p < 0,0001$) da MCPV. Os grupos P e NP de cada região também diferiram do grupo VG da região oposta da MCPA (Tabela 2, Figura 13).

Em contraste, os níveis de 5-HIAA diferiram apenas marginalmente quanto aos tratamentos ($F_{2,53} = 2,89$; $p < 0,06$). Conseqüentemente, a TR-5HT também apresentou diferenças significantes ($F_{5,46} = 19,0$; $p < 0,0001$) devidas, principalmente, aos tratamentos ($F_{2,46} = 42,9$; $p < 0,0001$), e em grau apenas marginal às áreas da MCPA ($F_{1,43} = 3,58$; $p < 0,06$) e à interação destes fatores ($F_{2,43} = 2,90$; $p < 0,06$). Tal como observamos para os níveis de 5-HT, a TR-5HT foi significativamente maior nos grupos P ($t = 5,6$; $p < 0,0001$) e NP ($t = 3,8$; $p < 0,0005$) da MCPD, e P ($t = 5,6$; $p < 0,0001$) e NP ($t = 7,0$; $p < 0,0001$) da MCPV, comparados aos grupos VG das respectivas áreas. A TR-5HT dos grupos P e NP de cada região também diferiram do grupo VG da região oposta da MCPA (Tabela 2, Figura 13).

Tabela 3. Concentrações de 5HT e 5HIAA, bem como a taxa de renovação de 5HT, das regiões dorsal e ventral da matéria cinzenta periaquedutal (MCPA) de ratos controles virgens (VG) e de ratos privados (P) ou ratos não privados (NP) da mãe. Dados representam a média \pm EPM. *, $P < 0,05$, diferente do grupo VG da mesma região da MCPA; # $P < 0,05$, diferente do grupo VG da outra região da MCPA (comparações *post hoc* corrigidas para o critério de 5% de Bonferroni).

MCPA	Grupo	N	5HT	5HIAA	5HT/5HIAA
Dorsal	VG	10	235,6 \pm 10,1	643,4 \pm 97,6	0,4 \pm 0,1
	NP	13	742,9 \pm 86,4 ^{*#}	561,8 \pm 112,7	1,21 \pm 0,07 ^{*#}
	P	12	860,7 \pm 113,4 ^{*#}	296,5 \pm 67,6	2,38 \pm 0,43 ^{*#}
Ventral	VG	12	312,6 \pm 46,3	708,8 \pm 127,3	0,5 \pm 0,1
	NP	13	1109,8 \pm 191,4 ^{*#}	598,1 \pm 176,1	5,74 \pm 2,43 ^{*#}
	P	9	1375,6 \pm 326,3 ^{*#}	493,0 \pm 91,0	2,35 \pm 0,39 ^{*#}

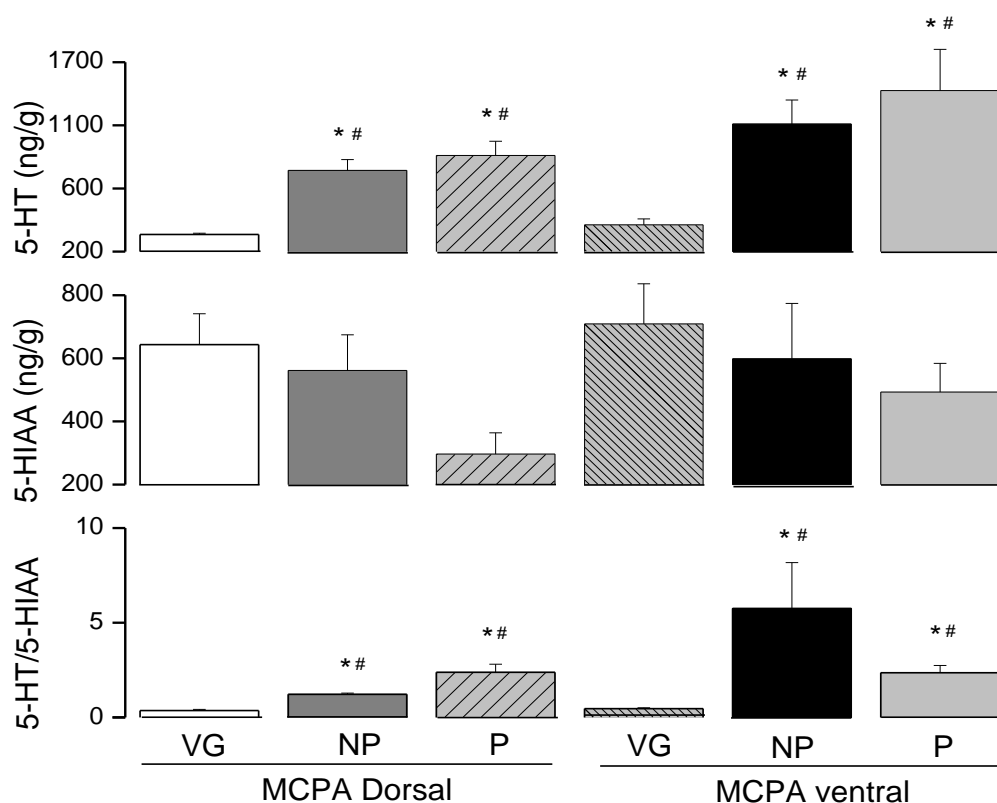


Figura 13. Níveis de 5-HT e 5-HIAA, e TR-5HT nas regiões dorsal e ventral da matéria cinzenta periaquedutal (MCPA) de ratos controles virgens (VG) e de ratos privados (P) ou ratos não privados (NP) da mãe. Dados representam a média \pm EPM. *, $P < 0,05$, diferente do grupo VG da mesma região da MCPA; # $P < 0,05$, diferente do grupo VG da outra região da MCPA (comparações *post hoc* corrigidas para o critério de 5% de Bonferroni).

DISCUSSÃO

Diversos estudos sugerem que as experiências adversas do período neonatal estejam associadas à disfunção dos sistemas monoaminérgicos e transtornos psiquiátricos (Arborelius e Eklund, 2007; Gartside 2003). Dentre as monoaminas, a 5-HT é um dos candidatos mais atraentes para ser o mediador dos efeitos tardios do estresse da primeira infância (Oreland *et al.*, 2009; Gartside *et al.*, 2003; Spinelli *et al.*, 2010). Em particular, a redução da neurotransmissão serotoninérgica na MCPD têm sido implicada na patogênese do TP (Deakin e Graeff, 1991; Graeff, 2003). Não se sabe, no entanto, se as alterações do sistema serotoninérgico estão envolvidas nos efeitos facilitadores do ISN sobre os comportamentos de defesa induzidos pela estimulação da MCPD (Quintino dos Santos, 2011).

Nossos resultados mostraram que os grupos P e NP apresentaram aumentos significativos de 5-HT e da TR-5HT em relação ao grupo VG, sem que houvesse a alteração dos níveis de 5-HIAA, indicando o aumento da síntese do neurotransmissor. Contudo, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos P e NP, tanto na MCPD quanto na MCPVL. Portanto, estes resultados sugerem que o aumento da síntese de 5-HT da MCPA dos ratos adultos foi devido ao estresse da manipulação dos filhotes (Plotsky *et al.*, 2005; Summers *et al.*, 2003), e não ao isolamento. Alternativamente, os níveis reduzidos de 5-HT do grupo VG podem ter sido devidos às condições específicas de sua criação. De fato, enquanto o grupo VG foi criado no biotério central, os grupos P e NP foram criados sob condições estritamente controladas do biotério do laboratório e provieram da mesma ninhada (*split-litter design*), compartilhando *background* genético e ambiente materno similares. Em todo caso, os dados deste estudo mostram que o ISN não tem efeitos diferenciados sobre o metabolismo da 5-HT.

Como o presente estudo utilizou o mesmo protocolo de Quintino dos Santos (2011), estes dados também sugerem que a facilitação da reação de defesa pelo ISN não foi devida a alterações no metabolismo da 5-HT. Contudo, a histoquímica de toda a MCPD pode ter mascarado efeitos seletivos

do ISN nas colunas dorsomedial, dorsolateral ou lateral desta estrutura. Por exemplo, evidências abundantes sugerem que as últimas colunas sejam o substrato de tipos diferentes de pânico associados a ameaças próximas/predação ou sufocamento, respectivamente (Schenberg, 2010; Schimittel *et al.*, 2012). Por outro lado, nossos resultados não excluem a alteração do metabolismo serotoninérgico em outras estruturas presumivelmente envolvidas nos ataques de pânico de ratos e humanos, tais como o núcleo hipotalâmico dorsomedial (Johnson e Shekhar, 2012) e região dorsomedial do núcleo ventromedial do hipotálamo (Alves, 2007; Canteras *et al.*, 1997; Javanmard *et al.*, 1999; Wilent *et al.*, 2010). Em particular, Rentesi e colaboradores (2010) relataram que ratos adultos que foram submetidos a um único período de privação materna de 24 h apresentaram hiperfunção serotoninérgica (aumento da TR-5HT) do hipotálamo e hipocampo, além de comportamento ansioso e respostas mais acentuadas de corticosterona e corticotrofina ao estresse.

Alternativamente, o ISN pode ter afetado a expressão dos receptores e transportadores de 5-HT (Matthews *et al.*, 2001; Vicentic *et al.*, 2006; Marais *et al.*, 2008). De fato, ratos adultos submetidos a procedimentos variados de privação materna apresentaram um aumento da sensibilidade do NDR à ação inibitória do citalopram (Arborelius *et al.*, 2004), redução da expressão de receptores 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} e 5-HT_{2C} e redução do transportador de 5-HT do tronco cerebral (Oreland *et al.*, 2009). Recentemente, Spinelli e colaboradores (2010) observaram que macacos juvenis que foram submetidos ao isolamento neonatal completo por 14 dias apresentaram uma diminuição na densidade dos receptores 5-HT_{1A} de regiões que podem ter envolvimento com a depressão, tais como o hipocampo, os córtices cingulados medial e anterior, amígdala, córtex pré-frontal dorsomedial e nos núcleos da rafe. Embora o presente estudo não tenha utilizado um protocolo tão extremo de isolamento social, os filhotes foram isolados por períodos de 3 h diárias ao longo de todo o período de amamentação (21 dias). Este protocolo pode ter causado a redução da expressão dos receptores 5-HT_{1A} da MCPD e a conseqüente facilitação dos comportamentos de defesa à estimulação desta estrutura (Brandão *et al.*, 1991; Bortoli *et al.*, 2006).

Como o NDR é a principal fonte de aferências serotoninérgicas da MCPD, os efeitos da privação materna nos níveis de 5-HT e receptores deste núcleo têm importância especial para o presente estudo. Por exemplo, embora Arborelius e Eklund (2007) tenham encontrado níveis mais elevados de 5-HT e 5-HIAA no NDR de ratas submetidas à privação materna de 6 h diárias, entre PN1 e PN13, Andersen e colaboradores (1999) não observaram diferença alguma nos níveis de 5-HT deste núcleo em ratos adultos que foram submetidos a um procedimento de privação praticamente idêntico ao do presente estudo. De forma similar ao que observamos para a MCPD, Andersen e colaboradores (1999) também observaram que os níveis de 5-HT do NDR dos grupos P e NP foram significativamente maiores que aqueles dos ratos virgens não manipulados. Portanto, exceto pela utilização de ninhadas de adoção cruzada, os resultados de Andersen e colaboradores (1999) são plenamente consistentes com os nossos resultados para a MCPD e MCPVL. Adicionalmente, a privação materna não parece ter efeitos nem na densidade dos receptores 5-HT_{1A} e do 5-HTT, nem nos níveis de triptofano hidroxilase, ou do RNAm dos receptores 5-HT_{1A} e 5-HT_{1B} do NDR (Gartside *et al.*, 2003; Arborelius *et al.*, 2004; Gardner *et al.*, 2005). No conjunto, estes resultados sugerem a ausência de efeitos do ISN no metabolismo e neurotransmissão serotoninérgica tanto da região dorsal quanto ventrolateral da MCPA.

Por outro lado, evidências abundantes mostram que os neurônios de projeção da MCPD são inibidos pelos agonistas serotoninérgicos, pela estimulação do NDR (Graeff, 2004), e pela estimulação da MCPVL (Hale *et al.*, 2012). Consequentemente, a ausência de diferença entre os grupos P e NP nos níveis de 5-HT da MCPA e NDR, bem como na densidade dos autorreceptores do NDR, reforçam a idéia do envolvimento de outros transmissores nos efeitos facilitatórios do ISN na reação de defesa à estimulação da MCPD. De fato, estudos recentes sugerem que os ataques de pânico sejam devidos a uma disfunção dos sistemas opióides envolvidos nos sistemas de alarme de separação e de sufocamento (Preter e Klein, 2008; Preter *et al.*, 2011). Embora esta hipótese não implique na co-localização anatômica destes mecanismos, os alarmes de separação e sufocamento parecem estar localizados nas colunas dorsolateral e lateral da MCPA,

respectivamente. De fato, estas colunas parecem estar envolvidas nas respostas respectivas à exposição aos predadores (principal ameaça ao filhote separado) e hipóxia e/ou hipercapnia (Canteras *et al.*, 2010; Schmitel, 2012; Johnson *et al.*, 2011). Por sua vez, a MCPVL inibe ambas as colunas da MCPA (Lovick, 1992) e apresenta níveis elevados de encefalinas (Chieng e Christie, 1994). Conseqüentemente, os ataques de pânico podem ser devidos a uma disfunção das projeções inibitórias serotoninérgicas e opioidérgicas da 'asa lateral' do NDR e MCPVL a ambas as colunas da MCPD (Johnson *et al.*, 2005, 2008; Schenberg, 2010; Schmitel *et al.*, 2012).

A conexão entre estresse de separação e opióides é baseada nas pesquisas de Panksepp e colaboradores (1997) sobre a neurobiologia dos laços sociais e de sua ruptura em animais. Este pesquisador verificou que doses baixas de opióides (oximorfina e morfina) reduziam tanto a vocalização quanto a agitação motora dos filhotes durante períodos breves de isolamento social. A participação do sistema opioidérgico no estresse de separação foi corroborada por vários autores (Ploj *et al.*, 1999; 2001, 2003; Ploj e Nylander, 2003; Marmendal *et al.*, 2004; Gustafsson *et al.*, 2007). Contudo, enquanto Ploj e colaboradores (2003) encontraram aumentos significantes dos níveis de dinorfina-B na MCPA de ratos adultos que foram submetidos à privação materna de 6 horas por dia, entre PN1 e PN21, outros pesquisadores não observaram alteração alguma nem na imunorreatividade à dinorfina-B, nem à metil-encefalina, na MCPA de ratos que foram submetidos aos mesmos procedimentos de privação (Marmendal *et al.*, 2004; Gustafsson *et al.*, 2007).

Estudos recentes em homens e animais apóiam a participação do sistema opióide nos ataques de pânico. De fato, Preter e colaboradores (2011) mostraram que indivíduos sadios pré-tratados com naloxona respondem ao lactato de sódio de forma similar ao que ocorre em pacientes de pânico. Em ratos, Roncon e colaboradores (2012) mostraram que a administração de naloxona, tanto periférica quanto intra-periaquedutal, reduz o efeito inibitório da administração de fluoxetina, tanto crônica (21 dias) quanto microinjetada na MCPD, na resposta de fuga dos braços abertos do labirinto-em-T elevado (LTE), um modelo de ataque de pânico. Estes resultados sugerem que os

efeitos panicolíticos dos ISRSs, tanto experimentais quanto clínicos, requerem a ativação de mecanismos opióides.

A privação materna também altera a expressão de vários peptídeos do hipocampo, incluindo o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), sinaptosina, fator neurotrófico neuronal (NGF), neurotrofina-3 (NT-3) e substância P (Unger *et al.*, 1988; Rosen *et al.*, 1992; Brodin *et al.*, 1994; Rupniak *et al.*, 2000; Roceri *et al.*, 2002; Andersen e Teicher, 2004; Marais *et al.*, 2008, 2009). Em particular, enquanto a administração intracerebroventricular de substância P produz respostas cardiovasculares características da reação de defesa (Unger *et al.*, 1988), a administração intraperiaquedutal dos fragmentos N- e C-terminais deste neuropeptídeo produziu efeitos ansiolíticos ou ansiogênicos, respectivamente (De Araújo *et al.*, 2001). Mais importante, Brodin e colaboradores (1994) relataram que ratos adultos isolados por 1 semana apresentaram um aumento na imunoreatividade à substância P na MCPD, mas nenhuma alteração na MCPV.

Concluindo, o presente estudo sugere que o ISN não tem efeitos diferenciados sobre o metabolismo da 5-HT da MCPA. Estes resultados ensejam a investigação dos eventuais efeitos do ISN na expressão dos receptores 5-HT e dos neuropeptídeos da MCPA.

ESTUDO II:

**EFEITOS DO DESAMPARO APRENDIDO (*LEARNED HELPLESSNESS*) NO
METABOLISMO DA SEROTONINA NA MATÉRIA CINZENTA
PERIAQUEDUTAL DORSAL E VENTROLATERAL DO RATO**

RESUMO

O transtorno do pânico (TP) é frequentemente comórbido com quadros depressivos. Contudo, o pânico experimental por estimulação da matéria cinzenta periaquedutal (MCPA) de ratos foi atenuado pelo desamparo aprendido (DA), um modelo de depressão reativa. Em particular, embora os ratos controles e desamparados tenham apresentado atenuações similares do pânico experimental 2 dias após o treino de DA, somente ratos desamparados apresentaram atenuações adicionais 7 dias após o treinamento. Evidências abundantes sugerem que a serotonina (5-HT) está envolvida no pânico e depressão. Portanto, este estudo examinou os efeitos do DA sobre os níveis de 5-HT e do seu principal metabólito (5-HIAA), bem como da taxa de renovação de 5-HT, nas regiões dorsal (MCPD) e ventrolateral (MCPVL) da MCPA. Para isto, ratos foram submetidos ao treino conjugado (*yoked*) de fuga de uma via, em caixas de vaivém, com choques escapáveis (CE, n=13) ou inescapáveis (CI, n=14). Sete dias após, os ratos foram sacrificados e a MCPD e MCPVL foram dissecadas para análise histoquímica por cromatografia de alto desempenho (HPLC). Comparado ao grupo controle virgem (VG, n=12), o grupo CI apresentou aumentos significantes dos níveis de 5-HT na MCPVL, enquanto o grupo CE apresentou estes aumentos na MCPD. Estes resultados são similares aos de outros autores que utilizaram microdiálise durante a exposição aos choques. Portanto, ao invés do aumento da liberação da 5-HT na MCPD, os efeitos inibitórios tardios do DA sobre o pânico experimental parecem ter sido devidos ao aumento dos níveis de 5-HT da MCPVL e/ou “asa lateral” do núcleo dorsal da rafe.

INTRODUÇÃO

Dentre os transtornos psiquiátricos, a depressão é uma das síndromes mais comuns. A causa desta doença parece ser multifatorial, incluindo a interação entre genes e traumas da infância ou vida adulta. Estes fatores podem contribuir para alterações tanto de neurotransmissão quanto de plasticidade neuronal subjacentes à depressão (Claes, 2004; Charney e Manji, 2004; Colman e Ataullahjan, 2010).

Por outro lado, o transtorno do pânico (TP) caracteriza-se por ataques recorrentes de intensa ansiedade acompanhados por sensações catastróficas e sintomas autonômicos e neurológicos acentuados, incluindo dispnéia, hipertensão, palpitação, dores no peito, sudorese, tremores e tontura, dentre outras (APA, 2000). Klein (1993) sugere, no entanto, que os principais sintomas dos ataques de pânico (AP) sejam dispnéia seguida de pânico, hiperventilação e desejo de fuga da situação imediata.

Embora a depressão caracterize-se por sintomas emocionais, motivacionais e cognitivos complexos (Pryce *et al.*, 2011), incluindo anedonia, anergia, distúrbio do sono e apetite, sentimentos de culpa, dificuldade de concentração, retardo psicomotor, pensamentos recorrentes sobre a morte e, inclusive, tentativas frequentes de suicídio (Charney e Manji, 2004; Dinan e Scott, 2005; Kennedy, 2008), o desamparo aprendido (DA) (*learned helplessness*) foi amplamente validado como um modelo de depressão. Este modelo foi descrito originalmente por Seligman e colaboradores (Overmier e Seligman, 1967; Seligman e Maier, 1967) e baseia-se nos efeitos comportamentais da ausência de controle sobre o estresse, os quais incluem a redução da atividade motora espontânea, déficits no aprendizado de uma nova tarefa e aumento do medo condicionado, dentre outros (Maier, 1984; Maier e Watkins, 2005; Amat *et al.*, 2006; Baratta *et al.*, 2009; Hammack *et al.*, 2011). Experimentos pareados em que dois animais recebem os mesmos choques, mas apenas um pode desligá-los (*yoked design*), mostraram que o DA não decorre dos choques em si, mas da ausência de controle sobre os mesmos (Seligman e Maier, 1967, Maier e Seligman, 1975). Seligman e colaboradores

sugeriram que os animais expostos ao choque inescapável aprendem que as respostas aos choques são inúteis, gerando déficits cognitivos e motivacionais em tarefas futuras, tal como ocorre nos pacientes com depressão (Maier e Seligman, 1975). Notavelmente, os efeitos comportamentais do DA são revertidos por tratamentos crônicos com antidepressivos tricíclicos, atípicos (iprindol e mianserina), inibidores seletivos da recaptação de 5-HT (citalopram, indalpina, fluvoxamina e zilmelidina) ou inibidores da monoaminoxidase (IMAO), administrados após a exposição aos choques inescapáveis. Ao contrário, os efeitos do DA não são atenuados por drogas ineficazes no tratamento da depressão, tais como os ansiolíticos, os neurolépticos e psicoestimulantes. Portanto, o modelo do DA apresenta alto valor preditivo (Cryan *et al.*, 2002; Willner, 1986), tendo sido usado tanto no estudo da neurobiologia da depressão quanto no desenvolvimento de novos antidepressivos (Maier e Watkins, 2005). Contudo, o DA também tem sido associado aos transtornos agudos ou pós-traumáticos de estresse (Petty *et al.*, 1994; Neumaier *et al.*, 1997; Maier, 2001).

Existe, por outro lado, uma notável similaridade entre os AP e as respostas aversivas evocadas pela estimulação da metade dorsal da matéria cinzenta periaquedutal (MCPA). Em humanos, a estimulação elétrica da MCPA produz intensa ansiedade, pânico, terror e sensações de morte iminente acompanhados pela abertura acentuada dos olhos, dispnéia, dores torácicas, sensações de frio ou calor, entre outros (Nashold *et al.*, 1969). Estas respostas são eliciadas pela estimulação da região dorsal (MCPD), mas não ventral (MCPV) da MCPA (Nashold *et al.*, 1969; Young, 1989). Em ratos, a estimulação da MCPD com intensidades baixas produz uma “reação de congelamento” (exoftalmia e imobilidade tensa), enquanto as intensidades mais elevadas causam respostas de fuga (trotes, galopes e saltos) (Schenberg *et al.*, 1993; Bittencourt *et al.*, 2004).

Notavelmente, o transtorno do pânico (TP) apresenta alta comorbidade com ansiedade de separação na infância e vários transtornos depressivos, estados relacionados à sensação de desamparo e, indiretamente, à agorafobia, um sintoma característico do TP (Cassano *et al.*, 1989; Klein, 1993b; Blandin *et al.*, 1994; Gorman, 1996; Gorman e Coplan, 1996; Johnson e

Lydiard, 1998; Ballenger, 1998; Dunner, 1998, 2001; Kaufman e Charney, 2000). Contrariamente, no entanto, o DA causou uma atenuação forte e prolongada (7 dias) dos comportamentos de defesa induzidos pela estimulação da MCPD (Quintino dos Santos, 2011). Embora estes efeitos possam estar relacionados às características específicas do DA (similar aos quadros de estresse e/ou 'depressão reativa', atualmente, transtorno de ajustamento com depressão), os mecanismos neuroquímicos destes efeitos permanecem completamente obscuros. Dentre estes, evidências abundantes, tanto clínicas quanto experimentais, sugerem que a serotonina (5-HT) seja um neurotransmissor fundamental nos transtornos de pânico e depressão (Deakin e Graeff, 1991). Portanto, o presente estudo avaliou o metabolismo da 5-HT nas regiões dorsal e ventrolateral da MCPA de ratos que foram submetidos ao procedimento do DA.

MATERIAIS E MÉTODOS

ANIMAIS

Ratos Wistar machos, pesando entre 230 – 270 g, fornecidos pelo biotério do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, eram mantidos numa sala com temperatura controlada (23°C) e ciclo claro-escuro (12 X 12 h, luzes acesas às 6:00 h). Os animais tinham livre acesso à água e comida e eram alojados em caixas individuais de polipropileno (30 cm X 20 cm X 13 cm) com assoalho coberto com serragem. Os procedimentos foram aprovados e realizados de acordo com o comitê de ética no uso de animais (CEUA-UFES PROTOCOLO 096/2011).

PROCEDIMENTOS

Procedimento de aprendizado de desamparo (PAD)

Após a pesagem, os ratos eram alocados aleatoriamente nos grupos choque-escapável (CE), choque-inescapável (CI) e virgens (VG). O grupo VG não foi submetido a nenhum procedimento e os grupos CE e CI foram submetidos ao PAD. O PAD foi induzido segundo o procedimento conjugado (*yoked*) de Seligman e Maier (1967). Para isto, foram utilizadas duas caixas de vaivém (*shuttle box*), a caixa-ativa e a caixa-clone, que tinham 46 cm de largura, 25 cm de altura e 24 cm de profundidade. As caixas eram divididas em compartimentos iguais por uma divisória que possuía uma abertura na parte inferior. Elas também possuíam tampas superiores e paredes frontais de acrílico transparente e um assoalho com grades de aço inoxidável eletrificadas “em paralelo” (Figura 14, ver Anexo). Este dispositivo possibilitava a aplicação de choques de mesma intensidade, duração e programação a ambos os ratos. Os choques eram controlados por um computador e aplicados por um gerador de choque munido de alternador aleatório da polaridade das barras (*scrambler*). Contudo, o choque de ambas as caixas somente era desligado quando o rato da caixa-ativa passava para o compartimento oposto. Ao contrário, as respostas do rato da caixa-clone não tinham nenhuma relação com a apresentação ou término dos choques.

No PAD (Tabela 4) os ratos CE e CI eram colocados nas respectivas caixas onde permaneciam por 1 minuto para habituação. Em seguida, eram aplicados 30 choques de 1 mA e 30 s de duração, em intervalos de 1 min, que eram desligados se o rato CE passasse uma única vez para o lado oposto da caixa-ativa (fuga de 1 via). Estas sessões (treinamento) eram conduzidas ao longo de 7 dias consecutivos. No 8º dia, os grupos CE e CI eram testados individualmente numa nova tarefa, a fuga de 2 vias (sessão-teste). Nesta, os ratos recebiam 30 choques de 1 mA e 10 s de duração, aplicados em intervalos de 1 minuto, e tinham que passar ao lado oposto e retornar para que o choque fosse desligado (Dalla *et al.*, 2008). Portanto, a latência máxima da fuga de 2 vias era de 10 s. Na sessão-teste o contexto era alterado com a fixação de fitas adesivas vermelhas nas paredes internas e

colocação de um chumaço de algodão, embebido em essência de canela, sob o assoalho.

Tabela 4: Protocolo dos grupos choque escapável e choque inescapável. PAD – procedimento de aprendizado do desamparo.

PAD		
Dia 1-7 (treino)	Dia 8 (sessão-teste)	Dia 14
Fuga 1 Via	Fuga 2 Vias	Preparação da amostra

A frequência e a latência média das fugas de 1 e 2 vias, bem como o número de travessias na sessão-teste, eram calculados *online* pelo *software* do equipamento. Ao término de cada sessão, as caixas eram limpas com um pano umedecido com álcool. Seis dias após a sessão-teste (Dia 14) os ratos eram pesados e sacrificados para remoção do cérebro e preparo das amostras para análise bioquímica (ver Estudo I).

RESULTADOS

Aprendizagem do Desamparo. Os ratos submetidos ao choque inescapável nas sessões de treinamento (Dias 1 a 7) apresentaram déficits significantes do aprendizado da fuga de 2-vias na sessão teste (Dia 8) (Tabela 5).

Efeito do desamparo aprendido sobre o peso corporal. Os pesos corporais (média±EPM) dos grupos CE e CI foram virtualmente idênticos, tanto no início do experimento (248±6 g e 247±5 g, respectivamente) quanto no dia do sacrifício para preparação das amostras (316±11 g e 309±6 g, respectivamente).

Tabela 5. Número médio de travessias e fugas de 2 vias, e latência média das fugas de 2 vias dos grupos CE e CI na sessão-teste (8º dia). Os valores representam as médias±EPM. *, $p<0,001$; **, $p<0,0001$, diferenças significantes em relação ao grupo CE (teste-t para amostras independentes).

Grupos	Nº de Travessias	Fugas de 2 Vias	
		Número	Latência
CE	2,0±0,5	16±1,6	3,7 ± 0,3
CI	1,0±1,0	0**	10 ± 0,8*

Efeito do desamparo aprendido nos níveis teciduais de 5-HT, 5-HIAA e 5-HT/HIAA na matéria cinzenta periaquedutal dorsal e ventral. Os grupos apresentaram níveis significativamente diferentes de 5-HT ($F_{5,65} = 4,0$; $p<0,005$). Esta diferença foi exclusivamente devida ao choque ($F_{2,65} = 8,6$; $p<0,0005$), e não à região da MCPA. Comparado ao respectivo grupo VG, os níveis de 5-HT foram significativamente maiores na MCPD do grupo CE ($t = 3,5$; $p<0,001$). Os níveis de 5-HT deste grupo também foram mais elevados que os níveis da região ventral da MCPA dos ratos VG ($t = 3,2$; $p<0,002$). Os níveis de 5-HT da MCPV do grupo CI também foram significativamente maiores que aqueles do grupo VG da MCPD ($t = 3,1$; $p<0,003$). A comparação da MCPV, isoladamente, também resultou em diferenças estatísticas significantes nos níveis de 5-HT ($F_{2,34}=3,57$; $p<0,04$). Mais importante, a comparação pareada mostrou que os níveis de 5-HT do grupo CI foram estatisticamente maiores que aqueles do grupo VG ($p<0,01$), atingindo o critério de 5% de Bonferroni.

Em contraste, não foram observadas diferenças significativas entre grupos para as concentrações de 5-HIAA. Os grupos também diferiram significativamente quanto à taxa de renovação (TR-5HT) do neurotransmissor ($F_{5,60} = 3,3$; $p<0,01$). Esta diferença foi devida ao tratamento ($F_{2,60} = 7,9$; $p<0,001$) e não à região da MCPA. Também foram observados aumentos marginais da taxa de renovação de 5-HT da MCPD do grupo CE em relação aos valores de ambas as áreas do grupo VG que, no entanto, não atingiram significância estatística para o critério de 5% de Bonferroni.

Tabela 6. Concentrações de 5HT e 5HIAA (ng/g), bem como a taxa de renovação de 5HT, das regiões dorsal e ventral da matéria cinzenta periaquedutal (MCPA) de ratos controles virgens (VG) ou ratos submetidos a choques escapáveis (CE) ou inescapáveis (CI). Dados representam a média \pm EPM. *, $P < 0,05$, diferente do grupo VG da mesma região da MCPA; # $P < 0,05$, diferente do grupo VG da outra região da MCPA (comparações *post hoc* corrigidas para o critério de 5% de Bonferroni).

MCPA	Grupo	N	5HT	5HIAA	5HT/5HIAA
Dorsal	VG	10	235,6 \pm 10,1	643,4 \pm 97,6	0,4 \pm 0,1
	CE	10	1799,0 \pm 613,7 ^{*#}	647,5 \pm 101,3	2,5 \pm 0,8
	CI	14	834,6 \pm 188,3	498,6 \pm 55,1	1,8 \pm 0,5
Ventral	VG	12	312,6 \pm 46,3	708,8 \pm 127,3	0,5 \pm 0,1
	CE	13	847,7 \pm 234,3	539,3 \pm 84,6	1,9 \pm 0,6
	CI	14	1343,7 \pm 393,9 ^{*#}	676,1 \pm 79,6	2,5 \pm 1,0

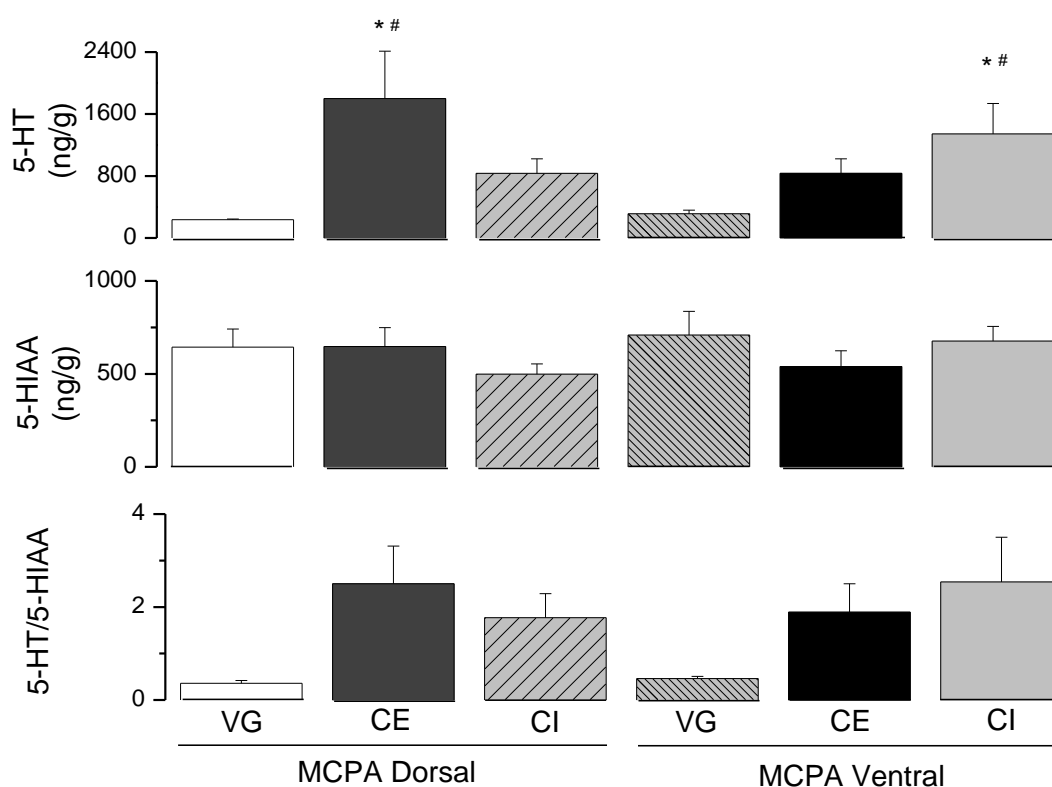


Figura 3: Níveis de 5-HT, 5-HIAA e TR-5HT nas regiões dorsal e ventral da matéria cinzenta periaquedutal (MCPA) de ratos controles virgens (VG) ou ratos submetidos a choques escapáveis (CE) ou inescapáveis (CI). Dados representam a média \pm EPM. *, $P < 0,05$, diferente do grupo VG da mesma região da MCPA; # $P < 0,05$, diferente do grupo VG da outra região da MCPA (comparações *post hoc* corrigidas para o critério de 5% de Bonferroni).

DISCUSSÃO

Comparados aos ratos do grupo CE, os ratos submetidos ao CI apresentaram déficits significativos de aprendizagem de uma tarefa nova (fuga de 2 vias), confirmando o desenvolvimento do desamparo. De acordo com Seligman e colaboradores (1975), os déficits cognitivos e motivacionais deste modelo são similares à depressão em humanos, uma vez que os animais “aprendem que as respostas ao CI são inúteis”. Estes déficits não se limitam aos comportamentos motivados pelo estímulo utilizado no treino do DA, podendo ocorrer até mesmo com comportamentos reforçados positivamente (Valentino *et al.*, 1990). De fato, ratos submetidos aos CI apresentam déficits cognitivos no labirinto aquático de Morris (Song *et al.*, 2006). Adicionalmente, a exposição ao CI aumenta a duração dos períodos de imobilidade após a remoção da plataforma submersa do labirinto de Morris, um efeito que foi atenuado por administrações diárias de desipramina ou fluoxetina (Schulz *et al.*, 2007). Contrariamente, no entanto, Vollmayr e colaboradores (2004) relataram que ratos com predisposição genética ao DA e anedonia (consumo reduzido de sacarose) apresentaram desempenho normal no labirinto de Morris. No mesmo sentido, Quintino dos Santos (2011) relatou que enquanto o tempo de flutuação no teste da natação forçada foi equivalente para os grupos controle e CI, ele foi significativamente atenuado no grupo CE, sugerindo o aumento da resiliência comportamental ao estresse do último grupo.

Os resultados do presente estudo também mostram que os níveis de 5-HT estão aumentados na MCPD e MCPVL dos grupos CE e CI, respectivamente, sem que haja alterações dos níveis de 5-HIAA. De forma similar, estudos de microdiálise durante a exposição aos choques mostraram que enquanto a concentração extracelular de 5-HT da MCPD é aumentada no grupo CE, ela permanece inalterada no grupo CI (Amat *et al.*, 1998). Tal como no presente estudo, Amat e colaboradores (1998) não observaram alteração alguma dos níveis de 5-HIAA. Conseqüentemente, os resultados deste e do nosso estudo sugerem que os aumentos dos níveis de 5-HT na MCPD e MCPVL foram devidos ao aumento da síntese do neurotransmissor, e não à

redução de sua metabolização. Nossos resultados também mostram que a síntese de 5-HT da MCPA permanece aumentada por, pelo menos, 7 dias após o treinamento do DA. No mesmo sentido, Rozeske e colaboradores (2011) observaram que os neurônios serotoninérgicos do NDR, principal fonte das aferências serotoninérgicas da MCPA, permanecem sensibilizados à 5-HT por até 3 dias após o treinamento do DA. Em adição, a inibição do NDR pela microinjeção de ipsapirona (um agonista de receptores 5-HT_{1A}) foi atenuada por uma semana após o treinamento do DA, um curso temporal similar ao observado no presente estudo.

Mais importante, no entanto, os resultados do presente estudo sugerem que os níveis de 5-HT da MCPD e MCPVL estejam correlacionados à controlabilidade ou incontrolabilidade do estresse, respectivamente, adicionando novas evidências do envolvimento do sistema serotoninérgico nos mecanismos do DA (Edwards *et al.*, 1986; Maier e Watkins, 1998, 2005). Por exemplo, no que diz respeito ao NDR, Grahn e colaboradores (1999) mostraram que o CI causa a ativação preferencial dos neurônios serotoninérgicos. No mesmo sentido, Maier e colaboradores (1993) relataram que lesões eletrolíticas do NDR preveniram tanto o déficit de aprendizado da resposta de fuga quanto o aumento do medo condicionado dos ratos expostos ao CI, mas não tiveram efeitos no grupo CE. Adicionalmente, a inibição do NDR pela microinjeção de 8-OH-DPAT preveniu os efeitos do DA (Maier *et al.*, 1995). Conseqüentemente, Maier e Watkins (2005) sugeriram que a atividade excessiva dos neurônios serotoninérgicos do NDR é necessária para a expressão dos efeitos do DA. Maier e colaboradores (2006) também sugeriram que a controlabilidade do estresse é detectada pelas áreas pré-límbica (PL) e infralímbica (IL) do córtex pré-frontal medial (CPFm) que se projetam para o NDR (Pryce *et al.*, 2011; Gabbott *et al.*, 2005) e colunas dorsolateral e ventrolateral da MCPA, respectivamente (Floyd *et al.*, 2000). Embora estas projeções sejam predominantemente glutamatérgicas, elas fazem sinapse com interneurônios gabaérgicos do NDR (Jankowski & Sesack, 2004), inibindo a liberação de 5-HT sob condições de estresse controlável (Celada *et al.*, 2001; Pryce *et al.*, 2011). De fato, estudos recentes de Amat e colaboradores (2008) mostraram que a infusão de muscimol (um agonista de receptores GABA-A) no

CPFm produziu déficits da resposta de fuga nos ratos pré-expostos aos CE, enquanto a administração de picrotoxina (um antagonista de receptores GABA-A) melhorou o desempenho de ratos pré-expostos aos CI.

Contrariamente, no entanto, estudos anteriores do mesmo grupo (Amat *et al.*, 1998) mostraram que os níveis extracelulares de 5-HT da MCPD estão significativamente aumentados durante a exposição aos CE, mas não são alterados na exposição ao CI. Embora estes autores não tenham analisado a MCPV, os aumentos dos níveis de 5-HT da MCPD do grupo CE estão de acordo com os nossos resultados. Por outro lado, como o NDR projeta-se para várias áreas além da MCPD (Pryce *et al.*, 2011), os efeitos emocionais e déficits cognitivos decorrentes da exposição ao CI podem ter sido devidos às suas projeções para o estriado (déficit da fuga), amígdala (aumento da ansiedade), ou MCPV (inibição de respostas tipo pânico). De fato, enquanto o aumento da ansiedade dos ratos desamparados parece ser processado na amígdala (Maier *et al.*, 1993; Christianson *et al.*, 2010), a inibição prolongada das respostas de defesa à estimulação da MCPD dos ratos desamparados (Quintino dos Santos, 2011) pode estar relacionada ao aumento dos níveis de 5-HT da MCPV relatados neste estudo.

Por outro lado, as respostas agudas do sistema serotoninérgico podem resultar em efeitos crônicos por meio de alterações sinérgicas com outros sistemas de sinalização, incluindo o CRH, neuropeptídeo Y, BDNF e substância P (Siuciak, 1997, 1998; Berton *et al.* 2007; Tan *et al.*, 2004). Em particular, existem evidências de que o desamparo produza mudanças persistentes no eixo HPA (O'Connor *et al.*, 2004). Assim, Hammack *et al.* (2002, 2003) observaram que aplicação de CRH no NDR mimetizou o déficit do aprendizado em ratos que não foram expostos ao CI. Adicionalmente, Tan e colaboradores (2004) sugeriram que o CRH produz um aumento crônico da atividade de interneurônios gabaérgicos do CPFm, o que facilitaria o desenvolvimento do DA (Pryce *et al.*, 2011). Contudo, Maier e colaboradores (1986) mostraram que a corticotrofina e a corticosterona são igualmente aumentadas nos grupos CE e CI em vários intervalos após o treinamento do DA, sugerindo que os efeitos acima não são fisiológicos.

A 5-HT também pode apresentar alterações sinérgicas com os neurônios de substância P da MCPV. Assim, Berton e colaboradores (2007) relataram que a exposição ao CI induz a ativação do gene precoce imediato (*immediate early gene*) Δ fosB, subregulando a expressão da substância P de neurônios da MCPVL que se projetam à área ventral tegumentar (AVT). Estes resultados são importantes, pois diferentemente do gene c-Fos, o fator ativador expresso pelo gene Δ fosB acumula-se com a repetição do estímulo e tem efeitos de longa duração. Em particular, os resultados destes autores sugerem que a redução na atividade destas projeções esteja envolvida no aumento da resiliência ao CI. Contrariamente, é tentador especular que um aumento da atividade destas projeções iniba os neurônios da AVT, reduzindo a gratificação do término do choque e produzindo anedonia.

De forma similar, os neurônios serotoninérgicos da MCPV também responderam diferencialmente ao CE e CI, apresentando aumentos mais acentuados da síntese de 5-HT no último grupo. Contudo, a despeito das evidências abundantes que sugerem que a MCPVL inibe a atividade da MCPD (Brandão *et al.*, 1991; Lovick, 1992, 1994; Stezkha & Lovick, 1994; Pobbe & Zangrossi, 2005), níveis de 5-HT na MCPD não foram alterados no grupo CI. Portanto, a atenuação da reação de defesa em ratos desamparados (Quintino dos Santos, 2011) foi provavelmente devida à ativação indireta de neurônios gabaérgicos (Lovick, 1992) ou opioidérgicos (Chieng e Christie, 1994) mediada pela 5-HT. Em particular, Roncon e colaboradores (2012) mostraram que a administração de naloxona, tanto periférica quanto intra-periaquedutal, reduz o efeito inibitório da fluoxetina, tanto crônica (i.p.) quanto aguda (i.c.), na resposta de fuga dos braços abertos do labirinto-em-T elevado (LTE), um modelo de ataque de pânico. De fato, os neurônios serotoninérgicos podem ser tonicamente inibidos por interneurônios gabaérgicos que expressam receptores opioidérgicos (Tao *et al.*, 1996; Maier e Watkins, 2005). Estes resultados sugerem que os efeitos panicolíticos da 5-HT podem ser mediados pela ativação do sistema opioidérgico. Também é importante salientar que os estímulos dolorosos são processados pela coluna ventrolateral da MCPA (Keay & Bandler, 2004). Por fim, o aumento dos níveis de 5-HT da MCPV também pode estar envolvido na expressão do gene Δ fosB de neurônios de substância

P, descrita acima (Berton et al., 2007). Em resumo, os efeitos do DA podem envolver o processamento paralelo e simultâneo do estresse incontável pela ativação das eferências nociceptivas à MCPV e a consequente inibição opioidérgicas da MCPD, pela ativação dos neurônios de substância P da MCPV e de suas projeções (inibitórias?) à AVT, e pela desativação das eferências do CPFm ao NDR e de suas projeções serotoninérgicas à MCPD.

Estudos anteriores do nosso laboratório observaram que a administração crônica de doses baixas de fluoxetina causou a inibição seletiva da resposta de galope induzida por estimulação da MCPD (Vargas e Schenberg, 2001; Schenberg *et al.*, 2001, 2002). Contrariamente, a maprotilina, um inibidor seletivo da recaptação de noradrenalina desprovido de efeitos panicolíticos, somente inibiu a resposta de imobilidade (Schenberg *et al.*, 2001). Com base nestes resultados, estes autores propuseram que o galope seja a resposta mais representativa dos ataques de pânico. Contudo, como a fluoxetina não teve efeitos sobre a resposta de trote, eles sugeriram que os ISRSs deslocam o repertório defensivo dos ratos do padrão de respostas a uma ameaça proximal (galopes) para as respostas menos intensas às ameaças distais (trote e imobilidade). De acordo com este modelo, os níveis elevados de 5-HT da MCPD do grupo CE inibiriam as respostas de fuga similares aos ataques de pânico (galopes e, talvez, saltos), favorecendo as respostas de trote (travessias) características da fuga da caixa de vaivém. Esta interpretação é compatível com o modelo de Deakin e Graeff (1991) e sugere que os efeitos da fluoxetina na reação de defesa à estimulação da MCPD sejam similares aos efeitos dos níveis aumentados de 5-HT da MCPD do grupo CE. Contudo, a situação é bastante diversa quanto à exposição ao CI, na qual ocorre uma atenuação tanto pronunciada quanto prolongada da maioria dos comportamentos de defesa tanto ao choque nas patas quanto à estimulação da MCPD, incluindo a imobilidade, trote, galope e, em menor grau, saltos (Quintino dos Santos, 2011). Portanto, nossos resultados sugerem que a desativação generalizada dos comportamentos de defesa dos ratos desamparados deve-se, à inibição indireta da MCPD, possivelmente, via mecanismos opioidérgicos mediados pelo aumento de liberação de 5-HT na MCPVL. Estes mecanismos estariam envolvidos tanto na inibição das

respostas de defesa dos ataques de pânico pelos agentes serotoninérgicos quanto na inibição destas respostas pelo estresse incontrolável, gerando a depressão reativa.

CONCLUSÕES

1. O ISN não tem efeitos diferenciados sobre o metabolismo da 5-HT da MCPA;
2. Embora a facilitação do pânico experimental nos ratos submetidos ao ISN não possa ser explicada por alterações da síntese de 5-HT, ela pode ser devida a alterações nos seus receptores ou outros transmissores;
3. Os estudos do DA mostram que o aumento prolongado da síntese de 5-HT na MCPD e MCPVL está correlacionado com a controlabilidade ou incontrolabilidade do estresse, respectivamente.
4. Os níveis elevados de 5-HT da MCPD do grupo CE inibem as respostas de fuga similares aos ataques de pânico (galopes e, talvez, saltos), favorecendo as respostas de trote (travessias) características da fuga da caixa de vaivém;
5. A atenuação da reação de defesa em ratos desamparados foi provavelmente devida à ativação indireta de neurônios gabaérgicos ou opioidérgicos mediada pela 5-HT na MPCVL;
6. O DA desativa o mecanismo motivacional da fuga.

REFERÊNCIAS

Ainsworth MDS and Bowlby J (1991) An ethological to personality development. *Am Psychol* 46: 331-341.

Alves ACA (2007) Funções comportamentais das divisões compacta e difusa do núcleo dorsomedial do hipotálamo de ratos. Dissertação de mestrado em Ciências Fisiológicas. UFES, Vitória.

Amat J, Matus-Amat P, Watkins LR, Maier SF (1998) Escapable and inescapable stress differentially and selectively alter extracellular levels of 5-HT in the ventral hippocampus and dorsal periaqueductal gray of the rat. *Brain Res* 797:12-22.

Amat J, Paul E, Zarza C, Watkins LR, Maier SF (2006) Previous experience with behavioral control over stress blocks the behavioral and dorsal raphe nucleus activating effects of later uncontrollable stress: role of the ventral medial prefrontal cortex. *J Neurosci* 26: 13264-13272.

Amat J, Paul E, Watkins LR, Maier SF (2008) Activation of the ventral medial prefrontal cortex during an uncontrollable stressor reproduces both the immediate and long-term protective effects of behavioral control. *Neuroscience* 154: 1178-1186.

Andersen SL, Lyss PJ, Dumont NL, Teicher MH (1999) Enduring neurochemical effects of early maternal separation on limbic structures. *Ann N Y Acad Sci* 877: 756-759.

Andersen SL, Teicher MH (2004) Delayed effects of early stress on hippocampal development. *Neuropsychopharmacology* 29:1988-1993.

Angst J and Wicki W (1993) The epidemiology of frequent and less frequent panic attacks. *Psychopharmacology of Panic*. Oxford Medical Publications.

APA (1980). *DSM-III: Diagnostic and Statistical Manual for Mental Disorders of American Psychiatric Association, Third Edition*, American Psychiatric Press Washington, DC.

APA (2000). DSM-IV-TR: Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders of American Psychiatric Association, Fourth Edition, American Psychiatric Press Washington, DC.

Arborelius L, Hawks BW, Owens MJ, Plotsky PM, Nemeroff CB (2004) Increased responsiveness of presumed 5-HT cells to citalopram in adult rats subjected to prolonged maternal separation relative to brief separation. *Psychopharmacology (Berl)* 176: 248-255.

Arborelius L and Eklund MB (2007) Both long and brief maternal separation produces persistent changes in tissue levels of brain monoamines in middle-aged female rats. *Neuroscience* 145: 738-750.

Armini RS (2012) Efeitos da estimulação elétrica da matéria cinzenta periaquedutal sobre a função do eixo hipotálamo hipófise adrenal em ratos Wistar. Dissertação de Mestrado em Ciências Fisiológicas. UFES, Vitória.

Ballenger JC (1998) Comorbidity of panic and depression: implications for clinical management. *Int Clin Psychopharmacol* 13 Suppl 4:S13-7.:S13-S17.

Bandler R, Carrive P, Depaulis A (1991) Emerging principles of organization in the midbrain periaqueductal gray matter. In A. Depaulis and R. Bandler (Eds.). *The midbrain periaqueductal gray matter: functional, anatomical and neurochemical organization*. Plenum, New York: 1-8.

Baratta MV, Zarza CM, Gomez DM, Campeau S, Watkins LR, Maier SF (2009) Selective activation of dorsal raphe nucleus-projecting neurons in the ventral medial prefrontal cortex by controllable stress. *Eur J Neurosci* 30: 1111-1116.

Battaglia M, Bertella S, Politi E, Bernardeschi L, Perna G, Gabriele A, Bellodi L (1995). Age at onset of panic disorder: influence of familial liability to the disease and of childhood separation anxiety disorder. *Am J Psychiatry* 152: 1362-1364.

Bernstein GA, Borchardt CM, Perwien AR, Crosby RD, Kushner MG, Thuras PD, Last CG (2000) Imipramine plus cognitive-behavioral therapy in the treatment of school refusal. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 39: 276-283.

Berton O, Covington HE, Ebner K, Tsankova NM, Carle TL, Ulery P, Bhonsle A, Barrot M, Krishnan V, Singewald GM, Singewald N, Birnbaum S, Neve RL, Nestler EJ (2007) Induction of deltaFosB in the periaqueductal gray by stress promotes active coping responses. *Neuron* 19, 55: 289-300.

Bittencourt AS, Carobrez AP, Zamprogno LP, Tufik S, Schenberg LC (2004) Organization of single components of defensive behaviors within distinct columns of periaqueductal gray matter of the rat: role of N-methyl-D-aspartic acid glutamate receptors. *Neuroscience* 125: 71-89.

Blanchard R, Flannelly KJ, Blanchard C (1986) Defensive behavior of laboratory and wild *Rattus norvegicus*. *J Comp Psychol* 100:101-107.

Blandin N, Parquet PJ, Bailly D (1994) Separation anxiety. Theoretical considerations. *Encephale* 20: 121-129.

de Bortoli V, Nogueira RL, Zangrossi H, Jr. (2006) Effects of fluoxetine and buspirone on the panicolytic-like response induced by the activation of 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} receptors in the rat dorsal periaqueductal gray. *Psychopharmacology (Berl)* 183:422-428.

Bowlby J (1983) *Attachment and Loss*. 2nd Edition, New York: Basic Books.

Bretherton I (1992) The origins of attachment theory: John Bowlby and Mary Ainsworth. *Dev Psychol* 28: 759-775.

Brodin E, Rosén A, Schött E, Brodin K (1994) Effects of sequential removal of rats from a group cage, and of individual housing of rats, on substance P, cholecystokinin and somatostatin levels in the periaqueductal grey and limbic regions. *Neuropeptides* 26: 253-260.

Canetti L, Bachar E, Galili-Weisstub E, De-Nour AK, Shalev AY (1997) Parental bonding and mental health in adolescence. *Adolescence* 32: 381-394.

Canteras NS, Chiavegatto S, Valle LE, Swanson LW (1997) Severe reduction of rat defensive behavior to a predator by discrete hypothalamic chemical lesions. *Brain Res Bull* 44:297-305.

Canteras NS, Resstel LB, Bertoglio LJ, Carobrez AP, Guimarães FS (2010) Neuroanatomy of anxiety. *Curr Top Behav Neurosci* (2) 77-96.

Carrive P (1993) The periaqueductal gray and defensive behavior: functional representation and neuronal organization. *Behavioral Brain Research* 58: 27-47.

Cassano GB, Perugi G, Musetti L, Akiskal HS (1989) The nature of depression presenting concomitantly with panic disorder. *Compr Psychiatry* 30:473-482.

Celada P, Puig MV, Casanovas JM, Guillazo G, Artigas F (2001) Control of dorsal raphe serotonergic neurons by the medial prefrontal cortex: involvement of serotonin -1A, GABA(A) and glutamate receptors. *J Neurosci* 21: 9917-9929.

Charney DS and Manji HK (2004) Life stress, genes, and depression: multiple pathways lead to increased risk and new opportunities for intervention. *Sci STKE* (225). re5.

Chiang B and Christie MJ (1994) Hyperpolarization by opioids acting on μ -receptors of a sub-population of rat periaqueductal gray neurones *in vitro*. *Br J Pharmacol* 113: 121-128.

Christianson JP, Ragole T, Amat J, Greenwood BN, Strong PV, Paul ED, Fleshner M, Watkins LR, Maier SF (2010) 5-hydroxytryptamine 2C receptors in the basolateral amygdala are involved in the expression of anxiety after uncontrollable traumatic stress. *Biol Psychiatry* 67 (4) 339-345.

Claes SJ (2004) CRH, stress, and major depression: a psychobiological interplay. *Vitam Horm* 69: 117-150

Cohen ME; White PD (1951) Life situations, emotions and neurocirculatory asthenia (anxiety neurosis, neurasthenia, effort syndrome). *Proceedings Association Res Nervous Mental Disease*. 13: 335-357.

Colman I, Ataullahjan A (2010) Life course perspectives on the epidemiology of depression. *Can J Psychiatry* 10: 622-632.

Cryan JF, Markou A, Lucki I (2002) Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. *Trends Pharmacol Sci* 23: 238-245.

Cryan JF, Page ME, Lucki I (2002) Noradrenergic lesions differentially alter the antidepressant-like effects of reboxetine in a modified forced swim test. *Eur J Pharmacol* 436:197-205.

Dalla C, Edgecomb C, Whetstone AS, Shors TJ (2008) Females do not express learned helplessness like males do. *Neuropsychopharmacology* 33: 1559-1569.

De Araujo JE, Huston JP, Brandão ML (2001) Opposite effects of substance P fragments C (anxiogenic) and N (anxiolytic) injected into dorsal periaqueductal gray. *Eur J Pharmacol* 432 (1) 43-51.

Deakin JFW and Graeff FG (1991) 5-HT and mechanisms of defence. *J Psychopharmacol* 5: 305-315.

Dijkstra H, Tilders FJH, Hiele MA & Smelik PG (1992) Hormonal reactions to fighting in rat colonies prolactin rises during defence, not during offence. *Physiology and Behavior* 51: 961-968.

Dinan TG, Scott LV (2005) Anatomy of melancholia: focus on hypothalamic-pituitary-adrenal axis overactivity and the role of vasopressin. *J Anat* 207:259-264.

Dunner DL (2001) Management of anxiety disorders: the added challenge of comorbidity. *Depress Anxiety* 13:57-71.

Dunner DL (1998) The issue of comorbidity in the treatment of panic. *Int Clin Psychopharmacol* 13 Suppl 4:S19-24.:S19-S24.

Quintino dos Santos (2011) Determinantes biológicos da comorbidade dos ataques de pânico com depressão e ansiedade de separação. Tese de doutorado em Ciências Fisiológicas. UFES, Vitória.

Drevets WC, Videen TO, MacLeod AK, Haller JW, Raichle ME (1992) PET images of blood flow changes during anxiety: Correction. *Science* 256: 1696.

Dumont FS, Kinkead R (2010) Neonatal stress and attenuation of the hypercapnic ventilatory response in adult male rats: the role of carotid chemoreceptors and baroreceptors. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 299:R1279-R1289.

Edwards E, Johnson J, Anderson D, Turano P, Henn FA (1986) Neurochemical and behavioral consequences of mild, uncontrollable shock: effects of PCPA. *Pharmacol Biochem Behav* 25: 415-421

Faravelli C and Pallanti S (1989) Recent life events and panic disorder. *Am J Psychiatry* 146: 622-626.

Floyd NS, Price JL, Ferry AT, Keay KA, Bandler R (2000) Orbitomedial prefrontal cortical projections to distinct longitudinal columns of the periaqueductal gray in the rat. *J Comp Neurol* 422: 556-578.

Frances A, Miele GM, Widiger TA, Pincus HA, Manning D, Davis WW (1993) The classification of panic disorders: from Freud to DSM-IV. *J Psychiat Res* 27: 3-10.

Francis DD and Meaney MJ (1999) Maternal care and the development of stress response. *Curr Opin Neurobiol* 9: 128-134.

Freedman RR, Ianni P, Ettedgui E, Puthezhath N (1985) Ambulatory monitoring of panic disorder. *Arch Gen Psychiatry* 42: 244-248.

Freud S (1896) On the right to separate from neurasthenia a definite symptom-complex as "anxiety neurosis" (Angstneurose). In: *The major works of Sigmund Freud, great books of western world Encyclopedia Britannica, London, 1978.*

Gabbott PL, Warner TA, Jays PR, Salway P, Busby SJ (2005) Prefrontal cortex in the rat: projections to subcortical autonomic, motor, and limbic centers. *J Comp Neurol* 492: 145-177.

Gardner KL, Thrivikraman KV, Lightman SL, Plotsky PM, Lowry CA (2005) Early life experience alters behavior during social defeat: focus on serotonergic systems. *Neuroscience* 136: 181-191.

Gartside SE, Johnson DA, Leitch MM, Troakes C, Ingram CD (2003) Early life adversity programs changes in central 5-HT neuronal function in adulthood. *Eur J Neurosci* 17: 2401-2408.

Gentil V (1988) The aversive System, 5-HT and panic attacks. In: P Simon, P Soubrié and D Wildlocher (Eds), *Animal Models of Psychiatric Disorders*. Karger: Basel, p. 142-145.

Genest SE, Gulemetova R, Laforest S, Drolet G, Kinkead R (2004) Neonatal maternal separation and sex-specific plasticity of the hypoxic ventilatory response in awake rat. *J Physiol* 554:543-557.

Genest SE, Gulemetova R, Laforest S, Drolet G, Kinkead R (2007) Neonatal maternal separation induces sex-specific augmentation of the hypercapnic ventilatory response in awake rat. *J Appl Physiol* 102:1416-1421.

Genest SE, Balon N, Laforest S, Drolet G, Kinkead R (2007) Neonatal maternal separation and enhancement of the hypoxic ventilatory response in rat: the role of GABAergic modulation within the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *J Physiol* 583:299-314.

Gittelman-Klein R, Klein DF (1973) School phobia: diagnostic considerations in the light of imipramine effects. *J Nerv Ment Dis* 156:199-215.

Goetz RR, Klein DF, Gorman JM (1994) Consistencies between recalled panic and lactate-induced panic. *Anxiety* 1: 31-36.

Gorman JM (1996) Comorbid depression and anxiety spectrum disorders. *Depress Anxiety* 4:160-168.

Gorman JM, Coplan JD (1996) Comorbidity of depression and panic disorder. *J Clin Psychiatry* 57 Suppl 10:34-41; discussion 42-3.:34-41.

Graeff FG, Schoenfeld RI (1970) Tryptaminergic mechanisms in punished and nonpunished behavior. *J Pharmacol Exp Ther* 173:277-283.

Graeff FG (1976) Effect of cyproheptadine and combinations of cyproheptadine and amphetamine on intermittently reinforced lever-pressing in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 50:65-71.

Graeff FG (2003) 5-HT, matéria cinzenta periaquedutal e transtorno do pânico. *Revista Brasileira de Psiquiatria* 25 (Supl II) 42-5.

Graeff FG (2004) Serotonin, the periaqueductal Gray and panic. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 28: 239-259.

Graeff FG, Garcia-Leal C, Del-Ben CM, Guimarães FS (2005) Does the panic attack activate the hypothalamic-pituitary-adrenal axis? *An Acad Bras Cienc* 77: 477-491.

Graeff FG, Zangrossi HJ (2010) The dual role of serotonin in defense and the mode of action of antidepressants on generalized anxiety and panic disorders. *Central Nervous System Agents in Medicinal Chemistry* 10: 207-217.

Graeff FG (2012) New perspective on the pathophysiology of panic: merging serotonin and opioids in the periaqueductal gray. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 45: 1-10.

Grahn RE, Will MJ, Hammack SE, Maswood S, McQueen MB, Watkins LR, Maier SF (1999) Activation of serotonin-immunoreactive cells in the dorsal raphe nucleus in rats exposed to an uncontrollable stressor. *Brain Res* 826: 35-43.

Gustafsson L, Zhou Q, Nylander I (2007) Ethanol-induced effects on opioid peptides in adult male wistar rats are dependent on early environmental factors 146: 1137-1149.

Hale MW, Shekhar A, Lowry CA (2012) Stress-related Serotonergic Systems: Implications for Symptomatology of Anxiety and Affective Disorders. *Cell Mol Neurobiol* 32:695-708.

Hammack SE, Richey KJ, Schmid MJ, LoPresti ML, Watkins LR, Maier SF (2002) The role of corticotrophin-releasing hormone in the dorsal raphe nucleus

in mediating the behavioral consequences of uncontrollable stress. *J Neurosci* 22: 1020-1026.

Hammack SE, Schmid MJ, LoPresti ML, Der-Avakian A, Pellymounter MA, Foster AC, Watkins LR, Maier SF (2003) Corticotropin releasing hormone type 2 receptors in the dorsal raphe nucleus mediate the behavioral consequences of uncontrollable stress. *J Neurosci* 23: 1019-1025.

Hammack SE, Cooper MA, Lezak KR (2011) Overlapping neurobiology of learned helplessness and conditioned defeat: implications for PTSD and mood disorders. *Neuropharmacology* 1-11.

Heim C and Nemeroff CB (2001) The role of childhood trauma in the neurobiology of mood and anxiety disorders: preclinical and clinical studies. *Biol Psychiatry* 49: 1023-1039.

Hofer MA (1996) Multiple regulators of ultrasonic vocalization in the infant rat. *Psychoneuroendocrinology* 21:203-217.

Hollander E, e colaboradores (1989a) Cortisol and sodium lactate-induced panic. *Arch Gen Psychiatry* 46: 135-140.

Hollander E, e colaboradores (1989b) Prolactin and sodium lactate-induced panic. *Psychiatry Res* 28: 181-191.

Hoyler D, Hannon JP, Martin GR (2002) Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacol Biochem Behav* 71 (4): 533-554.

Hulshof HJ, Novati A, Sgoifo A, Luiten PG, Den Boer JA, Meerlo P (2011) Maternal separation decreases adult hippocampal cell proliferation and impairs cognitive performance but has little effect on stress sensitivity and anxiety in adult Wistar rats. *Behav Brain Res* 216:552-560.

Jankowski MP, Sesack SR (2004) Prefrontal cortical projections to the rat dorsal raphe nucleus: ultrastructural features and associations with serotonin and gamma-aminobutyric acid neurons. *J Comp Neurol* 468: 518-529.

Javanmard M, Shlik J, Kennedy SH, Vaccarino FJ, Houle S, Bradwejn J (1999) Neuroanatomic correlates of CCK-4-induced panic attacks in healthy humans: a comparison of two time points. *Biol Psychiatry* 45:872-882.

Jenck F, Moreau JL, Martin JR (1995) Dorsal periaqueductal gray-induced aversion as a simulation of panic anxiety: elements of face and predictive validity. *Psychiatry Res* 57: 181-191.

Johnson MR, Lydiard RB (1998) Comorbidity of major depression and panic disorder. *J Clin Psychol* 54:201-210.

Johnson PL, Hollis JH, Moratalla R, Lightman SL, Lowry CA (2005) Acute hypercarbic gas exposure reveals functionally distinct subpopulations of serotonergic neurons in rats. *J Psychopharmacol* 19:327-341.

Johnson P, Lowry C, Truitt W, Shekhar A (2008) Disruption of GABAergic tone in the dorsomedial hypothalamus attenuates responses in a subset of serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus following lactate-induced panic. *J Psychopharmacol* 22:642-652.

Johnson PL, Fitz SD, Hollis JH, Moratalla R, Lightman SL, Shekhar A, Lowry CA (2011) Induction of c-fos in 'panic/defence'-related brain circuits following brief hypercarbic gas exposure. *J Psychopharmacol* 25 (1) 26-36.

Johnson PL and Shekhar A (2012) An animal model of panic vulnerability with chronic disinhibition of the dorsomedial/perifornical hypothalamus. *Physiol Behav* 26.

Kagan J, Reznick JS, Snidman N, Gibbons J, Johnson MO (1988) Childhood derivatives of inhibition and lack of inhibition to the unfamiliar. *Child Development* 59:1580-1589.

Kaufman J, Charney D (2000) Comorbidity of mood and anxiety disorders. *Depress Anxiety* 12 Suppl 1:69-76.:69-76.

Kaunonen M, Paivi AK, Paunonen M, Erjanti (2000) Death in the Finnish family: experiences of spousal bereavement. *Int J Nurs Pract* 6: 127-134.

Keay KA, Bandler R (2004) Periaqueductal Gray. In: The Rat Nervous System (Paxinos G, ed), pp 243-257. San Diego: Elsevier.

Kennedy SH (2008) Core symptoms of major depressive disorder: relevance to diagnosis and treatment. *Dialogues Clin Neurosci* 10: 271-277.

Kiser RS, Lebovitz RM (1975) Monoaminergic mechanisms in aversive brain stimulation. *Physiol Behav* 15:47-53.

Kiser RS, Lebovitz RM, German DC (1978) Anatomic and pharmacologic differences between two types of aversive midbrain stimulation. *Brain Res* 155:331-342.

Kiser RS, German DC, Lebovitz RM (1978) Serotonergic reduction of dorsal central gray area stimulation-produced aversion. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 9:27-31.

Kiser RS, Brown CA, Sanghera MK, German DC (1980) Dorsal raphe nucleus stimulation reduces centrally elicited fearlike behavior. *Brain Res* 191:265-272.

Kosofsky BE, Molliver ME (1987) The serotonergic innervation of cerebral cortex: different classes of axon terminals arise from dorsal and median raphe nuclei. *Synapse* 1:153-168.

Kiser RS, Brown CA, Sanghera MK, German DC (1980) Dorsal raphe nucleus stimulation reduces centrally-elicited fear-like behavior. *Brain Res* 191: 265-72.

Klein DF (1964) Delineation of two drug-responsive anxiety syndromes. *Psychopharmacology* 5: 397-408.

Klein DF (1993b) False suffocation alarms, spontaneous panics, and related conditions. An integrative hypothesis. *Arch Gen Psychiatry* 50: 306-317.

Klein RG (1992) Pharmacotherapy of adolescent depression. *Clin Neuropharmacol* 15 Suppl 1 Pt A:227A-228A.:227A-228A.

Klein RG (1995) Is panic disorder associated with childhood separation anxiety disorder?. *Clinical Neuropharmacology* 18 (2): 7-14.

Klein DF and Fink M (1962) Psychiatric patterns to imipramine. *Am J Psychiat* 119: 432-438.

Lecrubier Y (1998) The impact of comorbidity on the treatment of panic disorder. *J Clin Psychiatry* 59 Suppl 8:11-4; discussion 15-6.:11-14.

Lecrubier Y and Ustün TB (1998) Panic and depression: a worldwide primary care perspective. *Int Clin Psychopharmacol* 4: 7-11.

Lehmann J and Feldon J (2000) Long-term biobehavioral effects of maternal separation in the rat: consistent or confusing? *Rev neurosci* 11: 383-408.

Levin AP and colaboradores (1987) Pituitary adrenocortical unresponsiveness in lactate-induced panic. *Psychiatry Res* 21: 23-32.

Liebowitz MR, e colaboradores (1984) Lactate provocation of panic attacks. I. Clinical and behavioral findings. *Arch Gen Psychiat* 41: 764-770.

Lim LW, Blokland A, van DM, Visser-Vandewalle V, Tan S, Vlamings R, Janssen M, Jahanshahi A, ziz-Mohammadi M, Steinbusch HW, Schruers K, Temel Y (2011) Increased plasma corticosterone levels after periaqueductal gray stimulation-induced escape reaction or panic attacks in rats. *Behav Brain Res* 218:301-307.

Lovick TA (1992) Inhibitory modulation of the cardiovascular defence response by ventrolateral periaqueductal grey matter in rats. *Exp Brain Res* 89: 133-139.

Lovick TA (1994) Influence of the dorsal and median raphe nuclei on neurons in the periaqueductal gray matter: role of 5-hydroxytryptamine. *Neuroscience* 59:993-1000.

Maier SF, Seligman ME (1975) Learned helplessness: theory and evidence. *J Exp Psychol* 105:3-46.

Maier SF (1984) Learned helplessness and animal models of depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 8: 435-446.

Maier SF, Ryan SM, Barksdale CM, Kalin NH (1986) Stressor controllability and the pituitary-adrenal system. *Behav Neurosci* 100:669-674.

Maier SF, Grahn RE, Kalman BA, Sutton LC, Wiertelak EP, Watkins LR (1993) The role of the amygdala and dorsal raphe nucleus in mediating the behavioral consequences of inescapable shock. *Behav Neurosci* 107 (2) 377-388.

Maier SF, Grahn RE, Watkins LR (1995) 8-OH-DPAT microinjected in the region of the dorsal raphe nucleus blocks and reverses the enhancement of fear conditioning and interference with escape produced by exposure to inescapable shock. *Behav Neurosci* 109:404-412.

Maier SF, Watkins LR (1998) Stressor controllability, anxiety, and serotonin. *Cogn Ther Res* 22:595-613.

Maier SF (2001) Exposure to the stressor environment prevents the temporal dissipation of behavioral depression/learned helplessness. *Biol Psychiatry* 49:763-773.

Maier SF and Watkins LR (2005) Stressor controllability and learned helplessness: the roles of the dorsal raphe nucleus, serotonin, and corticotropin-releasing factor. *Neurosci Biobehav R* 29: 829-841.

Maier SF, Amat J, Baratta MV, Paul E, Watkins LR (2006) Behavioral control, the medial prefrontal cortex and resilience. *Dialogues Clin Neurosci* 8: 397-406.

Manicavasagar V, Silove D, Marnane C, Wagner R (2009) Adult attachment styles in panic disorder with and without comorbid adult separation anxiety disorder. *Aust N Z J Psychiatry* 43(2): 167-172.

Marais L, Van Rensburg SJ, van Zyl JM, Stein DJ, Daniels WMU (2008) Maternal separation of rat pups increases the risk of developing depressive-like behavior after subsequent chronic stress by altering corticosterone and neurotrophin levels in the hippocampus. *Neurosci Res* 61: 106-112.

Marais L, Hattingh SM, Stein DJ, Daniels WM (2009) A proteomic analysis of the ventral hippocampus of rats subjected to maternal separation and escitalopram treatment. *Metab Brain Dis* 24:569-586.

Marmendal M, Roman E, Eriksson CJ, Nylander I, Fahlke C (2004) Maternal separation alters maternal care, but has minor effects on behavior and brain opioid peptides in adult offspring. *Dev Psychobiol* 45: 140-152.

Maron E, Kuikka JT, Shlik J, Vasar V, Vanninen E, Tiihonen J (2004) Reduced brain serotonin transporter binding in patients with panic disorder. *Psychiatry Res* 132: 173-181.

Matthews K, Dalley JW, Matthews C, Tsai TH, Robbins TW (2001) Periodic maternal separation of neonatal rats produces region-and-gender-specific effects on biogenic amine content in postmortem adult brain. *Synapse* 40:1-10.

Matthews K, Robbins TW (2003) Early experience as a determinant of adult behavioural responses to reward: the effects of repeated maternal separation in the rat. *Neurosci Biobehav Rev* 27:45-55.

McCauley J, Kem DE, Kolodner K, Dill L, Schroeder AF, deChant HK, Ryden J, Derogatis LR, Bass EB (1997) Clinical characteristics of women with a history of childhood abuse: unhealed wounds. *JAMA* 277: 1362-1368.

Meaney MJ, Aitken DH, Sharma S, Viau V (1992) Basal ACTH, corticosterone and corticosterone-binding globulin levels over the diurnal cycle, and age-related changes in hippocampal type I and type II corticosteroid receptor binding capacity in young and aged, handled and nonhandled rats. *Neuroendocrinology* 55:204-213.

Meaney MJ, Diorio J, Francis D, Widdowson J, LaPlante P, Caldji C, Sharma S, Seckl JR, Plotsky PM (1996) Early environmental regulation of forebrain glucocorticoid receptor gene expression: implications for adrenocortical responses to stress. *Dev Neurosci* 18: 49-72.

Meaney MJ (2001) Maternal care, gene expression, and the transmission of individual differences in stress reactivity across generations. *Annu Rev Neurosci* 24: 1161-1192.

Milrod B, Leon AC, Shear MK (2004) Can interpersonal loss precipitate panic disorder? *Am J Psychiatry* 161: 758-759.

Morgan MM, Carrive P (2001) Activation of the ventrolateral periaqueductal gray reduces locomotion but not mean arterial pressure in awake, freely moving rats. *Neuroscience* 102:905-910.

Mroczkowski MM, Goes FS, Riddle MA, Grados MA, Bienvenu OJ, Greenberg BD, Fyer AJ, McCracken JT, Rauch SL, Murphy DL, Knowles JA, Piacentini J, Cullen B, Rasmussen SA, Geller DA, Pauls DL, Liang KY, Nestadt G, Samuels JF (2011) Separation anxiety disorder in OCD. *Depress Anxiety* 28: 256-262.

Nashold BSJr, Wilson WP, Slaughter DG (1969) Sensations evoked by stimulation in the midbrain of man. *J Neurosurg* 30: 14-24.

Neill JD (1970) Effects of stress on serum prolactin and luteinizing hormone levels during the estrous cycle of the rat. *Endocrinology* 87: 1192-1197.

Neumaier JF, Petty F, Kramer GL, Szot P, Hamblin MW (1997) Learned helplessness increases 5-hydroxytryptamine_{1B} receptor mRNA levels in the rat dorsal raphe nucleus. *Biol Psychiatry* 41:668-674.

Neumeister A, Bain E, Nugent AC, Carson RE, Bonne O, Luckenbaugh DA, Eckelman W, Herscovitch P, Charney DS, Drevets WC (2004) Reduced serotonin type 1A receptor binding in panic disorder. *J Neuroscience* 24: 589-591

Nogueira RL, Graeff FG (1995) Role of 5-HT receptor subtypes in the modulation of aversion generated in the dorsal periaqueductal gray. *Pharmacol Biochem Behav* 52:1-6.

O'Connor KA, Ginsberg AB, Maksimova E, Wieseler Frank JL, Johnson JD, Spencer RL, Campeau S, Watkins LR, Maier SF (2004) Stress-induced sensitization of the hypothalamic-pituitary adrenal axis is associated with alterations of hypothalamic and pituitary gene expression. *Neuroendocrinology* 80:252-263.

Oliveira L, Graeff FG, Pereira SRC, Oliveira-Silva IF, Franco GC, Ribeiro AM (2010) Correlations among central serotonergic parameters and age-related emotional and cognitive changes assessed through the elevated T-maze and the Morris water maze. *AGE* 32: 187-196.

Onstott D, Mayer B, Beitz A (1993) Nitric oxide synthase immunoreactive neurons anatomically define a longitudinal dorsolateral column within the midbrain periaqueductal gray of the rat: analysis using laser confocal microscopy. *Brain Research* 610: 317: 324.

Oreland S, Pickering C, Gokturk, Oreland L, Arborelius L, Nylander I (2009) Two repeated maternal separation procedures differentially affect brain 5-hydroxytryptamine transporter and receptors in young and adult male and female rats. *Brain Re* 1305: S37-S49.

Overmier JB and Seligman MEP (1967) Effects of inescapable shock upon subsequent escape and avoidance learning. *J Comp Physiol Psychol* 63: 23-33.

Panksepp J, Nelson E, Bekkedal M (1997) Brain systems for the mediation of social separation-distress and social-reward. Evolutionary antecedents and neuropeptide intermediaries. *Ann N Y Acad Sci* 807: 78-100.

Paxinos G and Watson C (1998) *The rat brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press, San Diego.

Paxinos G (2004) *The Rat Nervous System*. 3.ed.

Petty F, Chae Y, Kramer G, Jordan S, Wilson L (1994) Learned helplessness sensitizes hippocampal norepinephrine to mild restrest. *Biol Psychiatry* 35:903-908.

Pine DS, Klein RG, Coplan JD, Papp LA, Hoven CW, Martinez J, Kovalenko P, Mandeli DJ, Moreau D, Klein DF, Gorman JM (2000) Differential carbon dioxide sensitivity in childhood anxiety disorders and nonill comparison group. *Arch Gen Psychiatry* 57: 960-967.

Pine DS, Klein RG, Roberson-Nay R, Mannuzza S, Moulton JL 3rd, Woldehawariat G, Guardino M (2005) Response to 5% carbon dioxide in

children and adolescents: relationship to panic disorder in parentes and anxiety disorders in subjects. *Arch Gen Psychiatry* 62: 73-80.

Pinheiro SN, Del-Ben CM, Zangrossi H Jr, Graeff FG (2008) Anxiolytic and panicolytic effects of escitalopram in the elevated T-maze. *Journal of Psychopharmacology* 22: 132-137.

Pitts FN, McClure JN (1967) Lactate metabolism in anxiety neurosis. *New Engl J Med* 277: 1329-1336.

Ploj K, Nylander I (2003) Long-term effects on brain opioid and opioid receptor like-1 receptors after short periods of maternal separation in rats. *Neurosci Lett* 345: 195-197

Ploj K, Pham TM, Bergström L, Mohammed AH, Henriksson BG, Nylander I (1999) Neonatal handling in rats induces long-term effects on dynorphin peptides. *Neuropeptides* 33: 468-474.

Ploj K, Roman E, Bergström L, Nylander I (2001) Effects of neonatal handling on nociceptin/orphanin FQ and peptide levels in female rats. *Pharmacol Biochem Behav* 69: 173-179.

Ploj K, Roman E, Nylander I (2003) Long-term effects of short and long periods of maternal separation on brain opioid peptide levels in male Wistar rats. *Neuropeptides* 37: 149-156.

Plotsky PM, Thrivikraman KV, Nemeroff CB, Caldji C, Sharma S, Meaney MJ (2005) Long-term consequences of neonatal rearing on central corticotrophin-releasing factor systems in adult male rat offspring. *Neuropsychopharmacology* 30: 2192-2204.

Pobbe RLH and Zangrossi H Jr (2005) 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} receptors in the rat dorsal periaqueductal gray mediate the antipanic-like effect induced by the stimulation of serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus. *Psychopharmacology* 183: 314-321.

Pobbe RLH, Zangrossi H Jr, Blanchard CD, Blanchard RJ (2010) Involvement of dorsal raphe nucleus and dorsal periaqueductal gray 5-HT receptors in the

modulation of mouse defensive behaviors. *European Neuropsychopharmacology* doi:10.1016.

Preter M and Klein DF (2008) Panic,, suffocation false alarms, separation anxiety and endogenous opioids. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 32: 603-612.

Preter M, Lee SH, Petkova E, Vannucci M, Kim S, Klein DF (2011) Controlled cross-over study in normal subjects of naloxone-preceding-lactate infusions, respiratory and subjective responses: relationship to endogenous opioid system, suffocation false alarm theory and childhood parental loss. *Psychol Med* 41: 385-393.

Pryce CR, Azzinnari D, Spinelli S, Seifritz E, Tegethoff M, Meinlschmidt G (2011) Helplessness: A systematic translational review of theory and evidence for its relevance to understanding and treating depression. *Pharmacology & Therapeutics* 1-26.

Rechlin T, Weis M, Spitzer A, Kashka WP (1994) Are affective disorders associated with alterations of heart rate variability? *J Affect Disord* 32: 271-275.

Reiman EM, Raichle ME, Robins E, Mintun MA, Fusselman MJ, Fox PT, Price JL, Hackman K (1989) Neuroanatomical correlates of a lactate-induced anxiety attack. *Arch Gen Psychiat* 46: 493-500.

Rentesi G, Antoniou K, Marcelos M, Fotopoulos A, Alboycharali J, Konstandi M (2010) Long-term consequences of early maternal deprivation in serotonergic activity and HPA function in adult rat. *Neuroscience Lett* 480: 7-11.

Repetti RL, Taylor SE, Seeman TE (2002) Risky families: family social environments and the mental and physical health of offspring. *Psychol Bull* 128: 330-336.

Roceri M, Hendriks W, Racagni G, Ellenbroek BA, Riva MA (2002) Early maternal deprivation reduces the expression of BDNF and NMDA receptor subunits in rat hippocampus. *Mol Psychiatry* 7: 609-616.

Roman E, Gustafsson L, Berg M, Nylander I (2006) Behavioral profiles and stress-induced corticosteroid secretion in male Wistar rats subjected to short and prolonged periods of maternal separation. *Horm Behav* 50:736-747.

Roncon CM, Biesdorf C, Santana RG, Zangrossi H Jr, Graeff FG, Audi EA (2012) The panicolytic-like effect of fluoxetine in the elevated T maze is mediated by serotonin-induced activation of endogenous opioids in the periaqueductal gray. *J Psychopharmacol*; Jan 24.

Rosén A, Brodin K, Eneroth P, Brodin E (1992) Short-term restraint stress and s.c. saline injection alter the tissue levels of substance P and cholecystokinin in the periaqueductal gray and limbic regions of rat brain. *Acta Physiol Scand* 3: 341-348.

Rots NY, de Jong J, Workel JO, Levine S, Cools AR, De Kloet ER (1996) Neonatal maternally deprived rats have as adults elevated basal pituitary-adrenal-activity and enhanced susceptibility to apomorphine. *J Neuroendocrinol* 7: 501-506.

Rozeske RR, Evans AK, Matthew GF, Watkins LR, Lowry CA, Maier SF (2011) Uncontrollable, but not controllable, stress desensitizes 5-HT_{1A} receptors in the dorsal raphe nucleus. *The Journal of Neuroscience* 40: 14107-14115.

Roy-Byrne PP, Geraci M, Uhde TW (1986) Life events and course of illness in patients with panic disorder. *Am J Psychiatry* 143:1033-1035.

Roy-Byrne PP, Stang P, Wittchen HU, Ustun B, Walters EE, Kessler RC (2000) Lifetime panic-depression comorbidity in the National Comorbidity Survey. Association with symptoms, impairment, course and help-seeking. *Br J Psychiatry* 176:229-35.:229-235.

Rupniak NM, Carlson EC, Harrison T, Oates B, Seward E, Owen S, de Felipe C, Hunt S, Wheeldon A (2000) Pharmacological blockade or genetic deletion of Substance P (NK(1)) receptors attenuates neonatal vocalization in guinea-pigs and mice. *Neuropharmacology* 39: 1413-1421.

Silove D, Manicavasagar V, Curtis J, Blaszczyński A (1996) Is early separation anxiety a risk factor for adult panic disorder?: a critical review. *Compr Psychiatry* 37:167-179.

Schenberg LC, Graeff FG (1978) Role of the periaqueductal gray substance in the antianxiety action of benzodiazepines. *Pharmacol Biochem Behav* 9:287-295.

Schenberg LC, Vasquez EC, Costa MB (1993) Cardiac baroreflex dynamics during the defence reaction in freely moving rats. *Brain Res* 621: 50-58.

Schenberg LC, Bittencourt AS, Sudré EC, Vargas LC (2001) Modeling panic attacks. *Neurosci Biobehav Rev* 25: 647-659.

Schenberg LC, Capucho LB, Vatanabe RO, Vargas LC (2002) Acute effects of clomipramine and fluoxetine on dorsal periaqueductal grey-evoked unconditioned defensive behaviors of the rat. *Psychopharmacology* 159: 138-144.

Schenberg LC, Póvoa RM, Costa AL, Caldellas AV, Tufik S, Bittencourt AS (2005) Functional specializations within the tectum defense systems of the rat. *Neurosci Biobehav Rev* 29 (8): 1279-98.

Schenberg LC, Dos Reis AM, Ferreira Póvoa RM, Tufik S, Silva SR (2008) A panic attack-like unusual stress reaction. *Horm Behav* 54:584-591.

Schenberg LC (2010) Towards a translational model of panic attack. *Psychol Neurosci* 3:9-37.

Schulz D, Buddenberg T, Huston JP (2007) Extinction-induced “despair” in the water maze, exploratory behavior and fear: effects of chronic antidepressant treatment. *Neurobiol Learn Mem* 87: 624-634.

Schütz MT, de Aguiar JC, Graeff FG (1985) Anti-aversive role of serotonin in the dorsal periaqueductal gray matter. *Psychopharmacology* 85:340-5.

Seligman MEP and Maier SF (1967) Failure to escape traumatic shock. *J Abnorm Psychol* 74: 1-9.

Seligman ME, Rosellini RA, Kozak MJ (1975) Learned helplessness in the rat: time course, immunization, and reversibility. *J Comp Physiol Psychol* 88:542-547.

Selye H (1936) A syndrome produced by diverse nocuous agents. *Nature* 138: 32.

Selye H (1950) *Stress. The physiology and pathology of exposure to stress.* Acta Med Publications, Montreal.

Shimitel FG, de Almeida GM, Pitol DN, Armini RS, Tufik S, Schenberg LC (2012) Evidence of a suffocation alarm system within the periaqueductal gray matter of the rat. *Neuroscience* 10.032

Siegel RA, Conforti N, Chowers I (1980) Neural pathways mediating the prolactin secretory responses to acute neurogenic stress in the male rat. *Brain Res* 198: 43-53.

Siuciak JA, Clark MS, Rind HB, Whittemore SR, Russo AF (1998) BDNF induction of tryptophan hydroxylase mRNA levels in the rat brain. *Journal of Neuroscience Research* 52: 149-158.

Slotten HA, Kalinichev M, Hagan JJ, Marsden CA, Fone KC (2006) Long-lasting changes in behavioural and neuroendocrine indices in the rat following neonatal maternal separation: gender-dependent effects. *Brain Res* 1097:123-132.

Soares VP, Zangrossi H Jr (2004) Involvement of 5-HT_{1A} and 5-HT₂ receptors of the dorsal periaqueductal gray in the regulation of the defensive behaviors generated by the elevated T-maze. *Brain Research Bulletin* 64: 181-188.

Soares VP, Zangrossi H Jr (2009) Stimulation of 5-HT_{1A} e 5-HT_{2A} receptors in the ventrolateral periaqueductal gray causes anxiolytic-, but not panicolytic-like effect in rats. *Behav Brain Res* 197 (1): 178-85.

Song L, Che W, Min-Wei W, Murakami Y, Matsumoto K (2006) Impairment of the spatial learning and memory induced by learned helplessness and chronic mild stress. *Pharmacol Biochem Behav* 83:186-193.

Souza AM Estudo da associação entre ansiedade de separação e transtorno do pânico (1996). Dissertação de Mestrado, Departamento de Psicologia e Psiquiatria Médica, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas.

Spinelli S, Chefer S, Carson RE, Jagoda E, Lang L, Heilig M, Barr CS, Suomi SJ, Higley JD, Stein EA (2010) Effects of early-life stress on serotonin_{1A} Receptors in Juvenile Rhesus Monkeys Measured by Positron Emission Tomography. *Biol Psychiatry* 67: 1146-1153.

Stein MB, Tancer ME, Uhde TW (1992) Heart rate and plasma norepinephrine responsivity to orthostatic challenge in anxiety disorders. Comparisons of patients with panic disorder and social phobia and normal control subjects. *Arch Gen Psychiatry* 49: 311-317.

Stezhka VV, Lovick TA (1994) Influence of the dorsal raphe nucleus on neurones in the midbrain defence area of the rat: electrophysiological and anterograde tracing studies in vitro. *J Physiol (London)* 476:46.

Summers CH, Kampshoff JL, Ronan PJ, Lowry CA, Prestbo AA, Korzan WJ, Renner KJ (2003) Monoaminergic activity in subregions of the raphe nuclei elicited by prior stress and the neuropeptide corticotrophin-releasing factor. *J Neuroendocrinol* 15: 1122-1133.

Tan, H; Zhong P; & Yan Z (2004) Corticotropin-releasing factor and acute stress prolongs serotonergic regulation of GABA transmission in prefrontal cortical pyramidal neurons. *J Neurosci* 24, 5000–5008.

Tao R, Zhiyuan M, Auerbach SB (1996) Differential regulation of 5-hydroxytryptamine release by GABAA and GABAB receptors in midbrain raphe nuclei and forebrain of rats. *Brain J Pharmacol* 119: 1375-1384.

Thompson AH, Bland RC, Orn HT (1989) Relationship and chronology of depression, agoraphobia, and panic disorder in the general population. *Journal of Nervous and Mental Disease* 177: 456-463.

Uchida S, Hara K, Kobayashi A, Funato H, Hobara T, Otsuki K, Yamagata H, McEwen BS, Watanabe Y (2010) Early life stress enhances behavioral

vulnerability to stress through the activation of REST4-mediated gene transcription in the medial prefrontal cortex of rodents. *J Neurosci* 30:15007-15018.

Unger T, Carolus S, Demmert G, ganten D, Lang RE, Maser-Gluth C, Steinberg H, Veelken R (1988) Substance P induces a cardiovascular defense reaction in the rat: pharmacological characterization. *Circ Res* 4: 812-820.

Valentino DA, Dufresne RL, Riccitelli AJ (1990) Effects of a single inescapable swim on long-term brain stimulation reward thresholds. *Physiol Behav* 48:215-219.

van Oers HJ, de Kloet ER, Levine S (1998) Early vs. late maternal deprivation differentially alters the endocrine and hypothalamic responses to stress. *Brain Res Dev Brain Res* 111:245-252.

Vargas LC and Schenberg LC (2001) Long-term effects of clomipramine and fluoxetine on dorsal periaqueductal grey-evoked innate defensive behaviours of the rat. *Psychopharmacology* 155: 260-268.

Vicentic A, Francis D, Moffet M, Lakatos A, Rogge G, Hubert GW, Harley J, Kuhar MJ (2006) Maternal separation alters serotonergic transporter densities and serotonergic 1A receptors in rat brain. *Neuroscience* 140: 355-365.

Vollmayr B, Bachteler D, Vengeliene V, Gass P, Spanagel R, Henn F (2004) Rats with congenital learned helplessness respond less to sucrose but show no deficits in activity or learning. *Behav Brain Res* 150:217-221.

Walker CD, Perrin M, Vale W, Rivier C (1986) Ontogeny of the stress response in the rat: role of the pituitary and the hypothalamus. *Endocrinology* 118:1445-1451.

Widom CS, DuMont K, Czaja SJ (2007) Prospective investigation of major depressive disorder and comorbidity in abused and neglected children grown up. *Arch Gen Psychiatry* 64: 49-56.

Wigger A, Neumann ID (1999) Periodic maternal deprivation induces gender-dependent alterations in behavioral and neuroendocrine responses to emotional stress in adult rats. *Physiol Behav* 66:293-302.

Wilent WB, Oh MY, Buetefisch CM, Bailes JE, Cantella D, Angle C, Whiting DM (2010) Induction of panic attack by stimulation of the ventromedial hypothalamus. *J Neurosurg* 112:1295-1298.

Willner P (1986) Validation criteria for animal models of human mental disorders: learned helplessness as a paradigm case. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 10: 677-690.

Wise CD, Berger BD, Stein L (1972) Benzodiazepines: anxiety-reducing activity by reduction of serotonin turnover in the brain. *Science* 177:180-183.

Wise CD, Berger BD, Stein L (1973) Evidence of α -noradrenergic reward receptors and serotonergic punishment receptors in the rat brain. *Biol Psychiatry* 6:3-21.

Woods SW, Charney DS, McPherson CA, Gradman AH & Heninger GR (1987a) Situational panic attacks. Behavioral, physiologic and biochemical characterization. *Arch Gen Psychiatry* 44: 365-375.

Woods SW, Charney DS, Goodman WK & Heninger GR (1987b) Carbon dioxide-induced anxiety: behavioral, physiologic and biochemical effects of carbon dioxide in patients with panic disorder and healthy subjects. *Arch Gen Psychiat* 45: 43-52.

Yamashita PS, de Bortoli VC, Zangrossi H Jr (2011) 5HT_{2c} receptor regulation of defensive responses in the rat dorsal periaqueductal gray. *Neuropharmacology* 60 (2-3): 216-222.

Young RF (1989) Brain and spinal stimulation: how and to whom! *Clin Neurosurg* 35:429-447.

Zeanah CH (1988) Atypical panic attacks and lack of resolution of mourning. *Gen Hosp Psychiatry* 10:373-377.

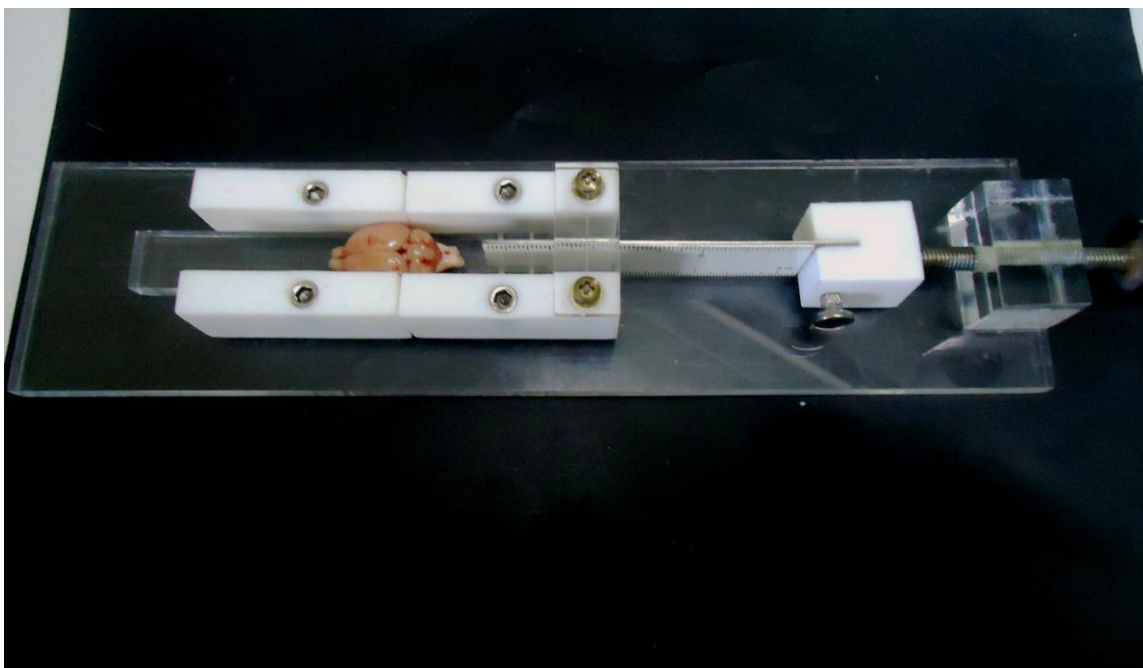
ANEXOS

Figura 5. Aparato de fabricação própria para realizar secções coronais de 1mm de espessura do cérebro do rato.

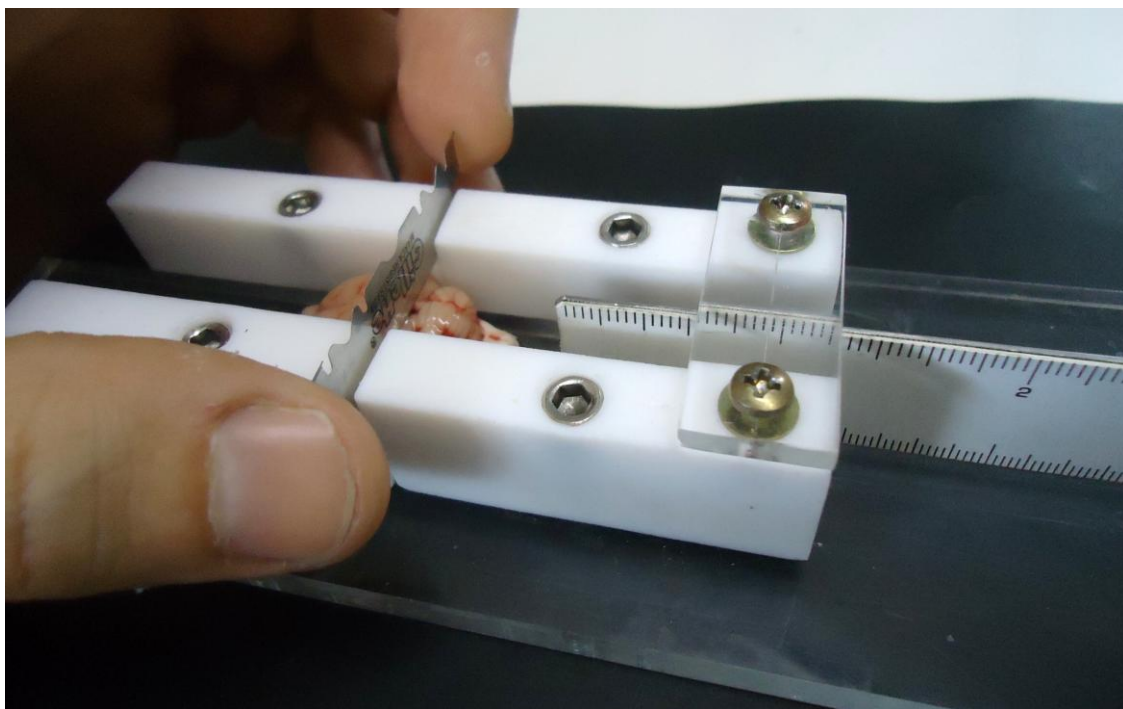


Figura 6. Cérebro sendo fatiado com uma lâmina.

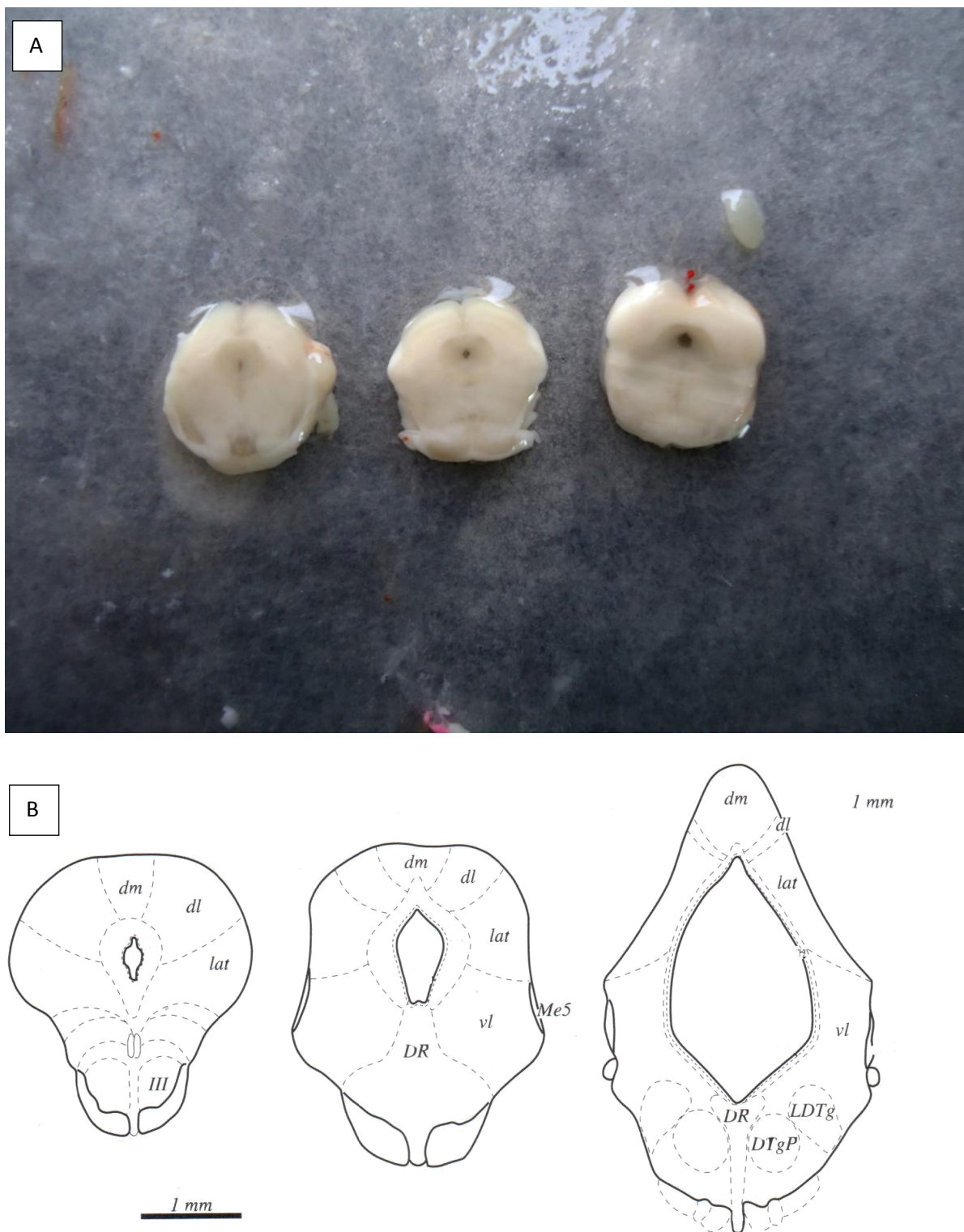


Figura 8. A. Secções coronais seriais da região que compreende a matéria cinzenta periaquedutal espaçadas por 1 mm, B. mostrando a organização colunar e radial. III, núcleo oculomotor; dm, coluna dorsomedial da MCPA; dl, coluna dorsolateral da MCPA; lat, coluna lateral da MCPA; vl, coluna ventrolateral da MCPA; DR, núcleo dorsal da rafe; Me5, núcleo mesencefálico trigeminal; LDTg, núcleo tegmentar dorsolateral; DTgP, núcleo tegmentar dorsal (Paxinos, 2004).



Figura 9. Picoteamento (*punch*) das regiões dorsais da MCPA.



Figura 10: Picoteamento (*punch*) das regiões dorsal e ventrolateral da MCPA.

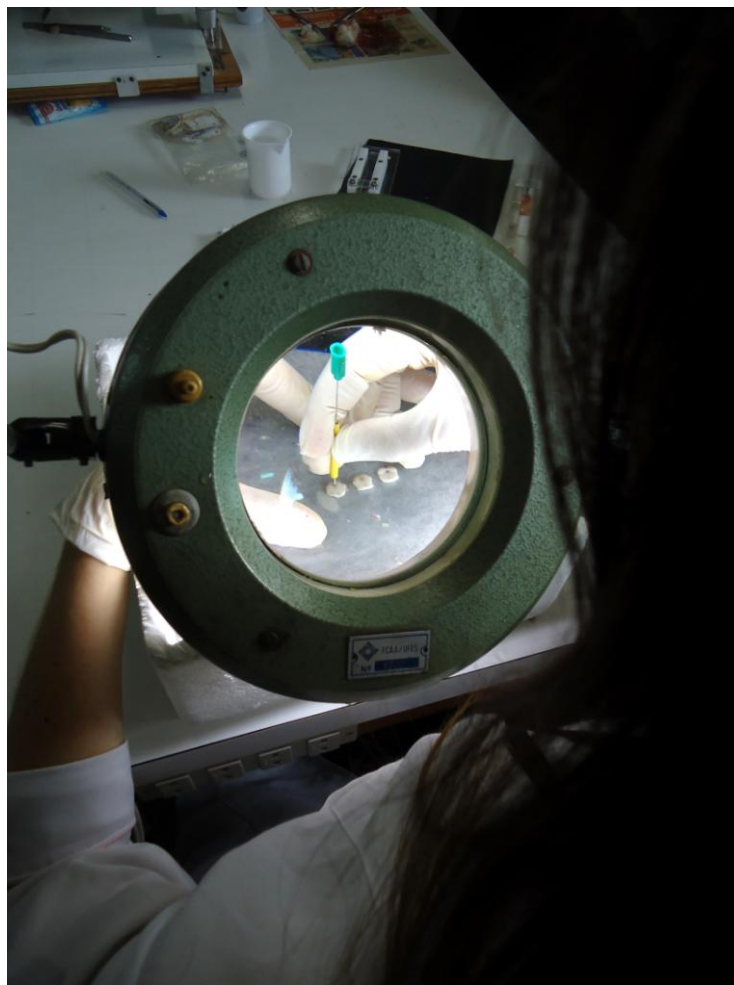


Figura 11. Picoteamento (*punch*) das regiões dorsal e ventrolateral da MCPA com uso da lupa e perfurador.

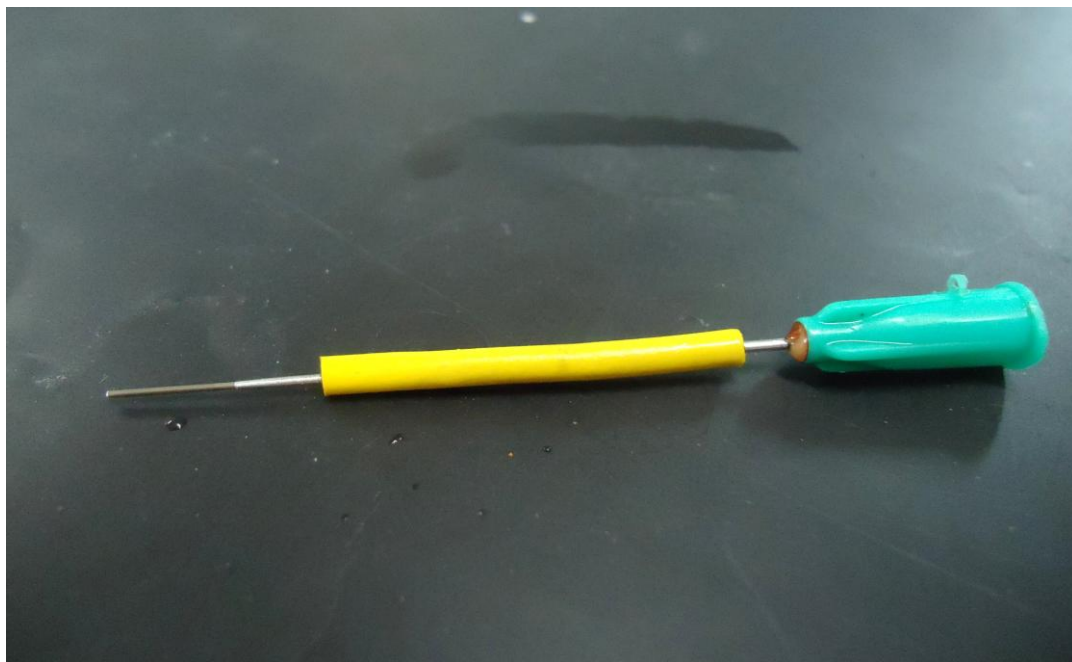


Figura 12. Perfurador de aço inoxidável feito com um segmento de catéter intravenoso para a realização do picoteamento (*punch*) das regiões dorsal e ventrolateral da MCPA.



Figura 14. Caixas de vaivém. Ambas são divididas em compartimentos iguais por uma divisória que possui uma abertura (porta) na parte inferior. Possuem tampas superiores e paredes frontais de acrílico transparente e assoalho com grades de aço inoxidável eletrificadas em paralelo.